

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**



**TESIS DOCTORAL**

**Papel homeostático e inflamatorio de neutrófilos  
senescentes**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**José M. Adrover Montemayor**

DIRECTORES

**Andrés Hidalgo Alonso**

**Madrid, 2018**

TESIS DOCTORAL

# Papel homeostático e inflamatorio de **neutrófilos senescentes**

José M. Adrover Montemayor

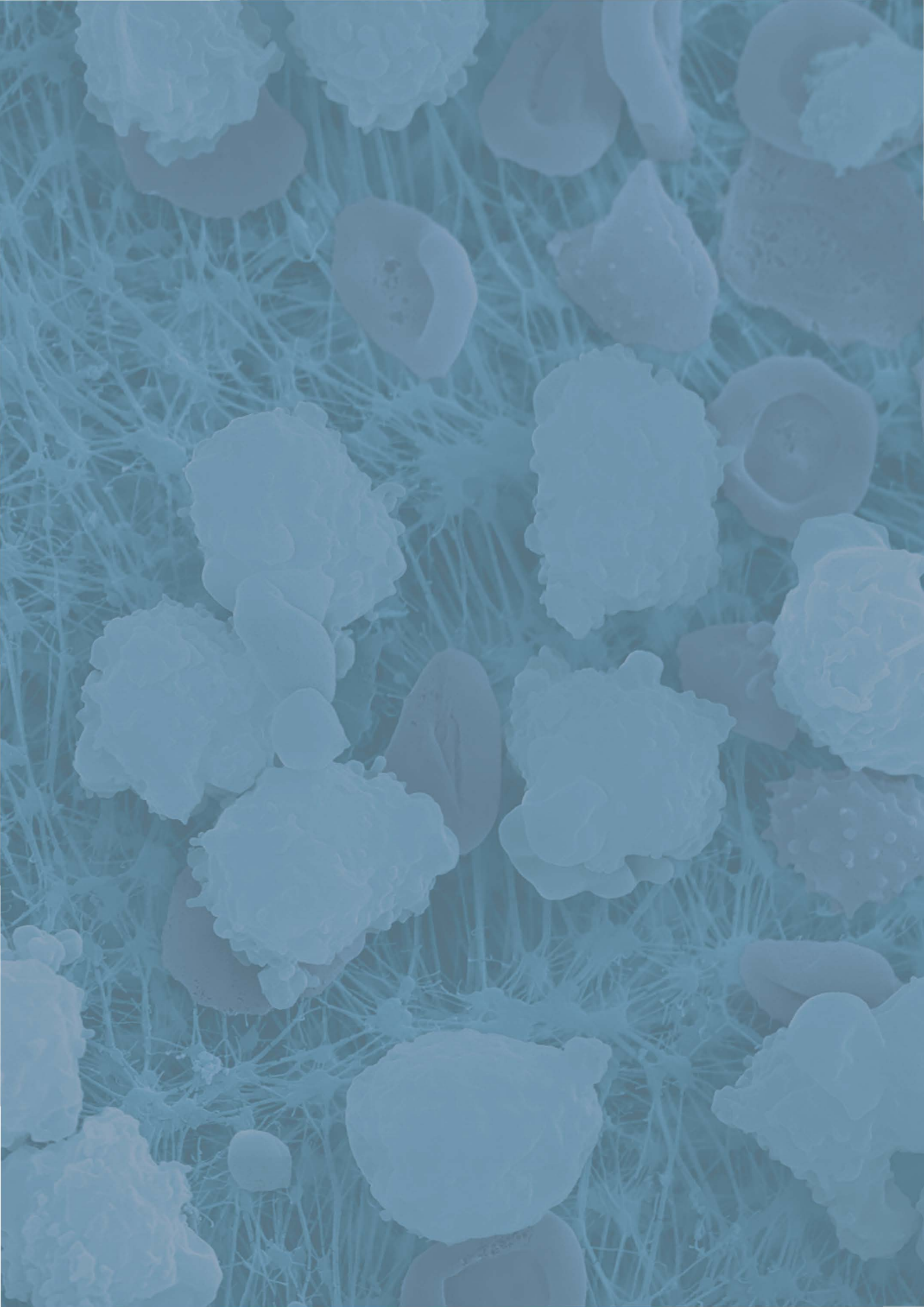
Dirigida por: Dr. Andrés Hidalgo Alonso

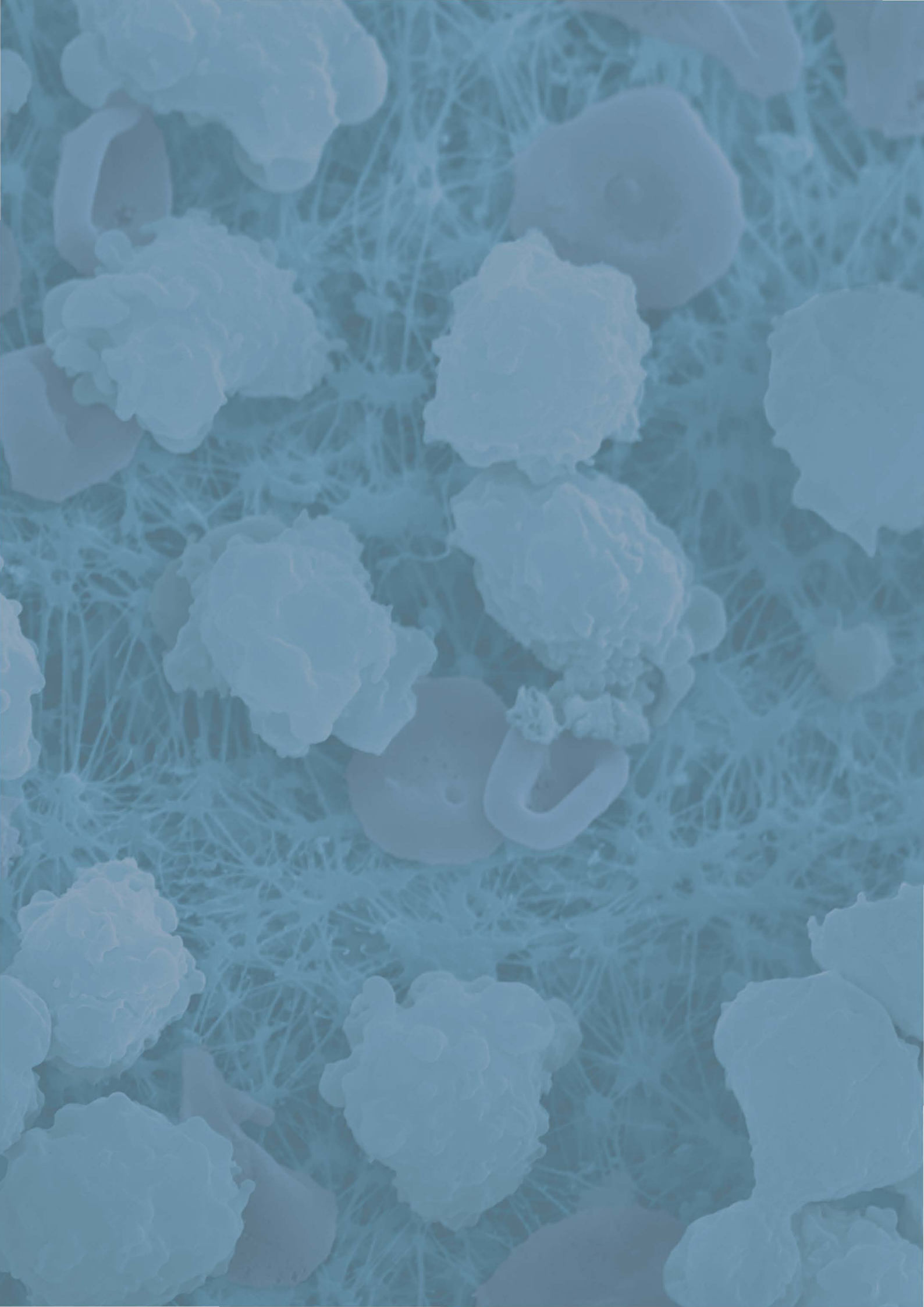


**cnic**

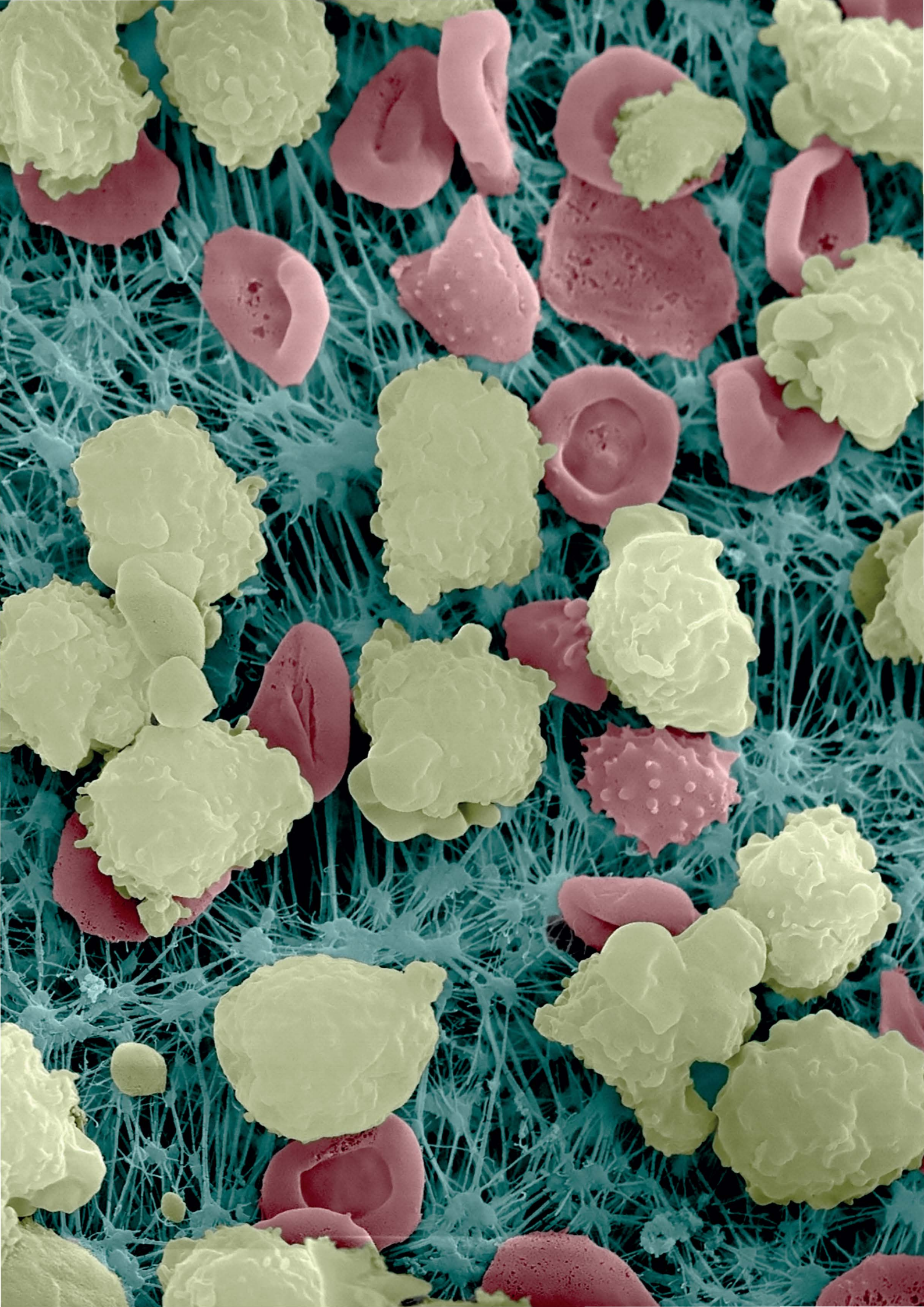














TESIS DOCTORAL

Papel homeostático e inflamatorio de  
**neutrófilos senescentes**

José M. Adrover Montemayor  
Dirigida por: Dr. Andrés Hidalgo Alonso

Doctorado en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina  
Universidad Complutense de Madrid



Realizada bajo la dirección del Dr. Andrés Hidalgo  
Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC)  
Instituto de Salud Carlos III (ISCIII)



Con la financiación del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad







*«La misma emoción, el mismo asombro y misterio, aparecen una y otra vez cuando observamos cualquier problema con la suficiente profundidad. Con más conocimiento se produce un misterio más profundo y más maravilloso, que nos atrae para penetrar todavía más profundamente. No nos preocupamos nunca porque la respuesta pueda resultar decepcionante, sino que con placer y confianza revolvemos cada nueva piedra para encontrar novedades no imaginadas que conducen a preguntas y misterios todavía más maravillosos; ¡ciertamente, es una gran aventura!»*

**Richard P. Feynman**





*A mis padres*





## Agradecimientos

**E**ste trabajo está dedicado a mis padres, a los que tengo que agradecer tantas cosas que no sé por dónde empezar. A mi madre y sus brazos para abrazar que me enseñaron el mundo (piedra<sup>piedra</sup>, casa<sup>casa</sup>, árbol<sup>árbol</sup>, tierra<sup>tierra</sup>), la poesía y el amor. Ella me enseñó a apreciar la belleza de las pequeñas cosas y a luchar por lo que es justo; a sobrellevar con cierto nivel de estoicismo los reveses y a aplaudir las alegrías, por más nimias que parezcan. Todas ellas (sobre todo el estoicismo) cualidades de todo punto imprescindibles cuando, por quinta vez consecutiva, fracasa el experimento de marras que has empezado a las cinco de la mañana.

A mi padre, que me ha enseñado con astucia la más importante de las cualidades, saber ponerse en las botas del otro (ese ser propio y ajeno), a evaluar las cosas desde varios puntos de vista, y asumir *a priori* en el discurso ajeno la mejor de las intenciones. Todo esto, parézcale al lector cosa extraña, me ha servido en la ciencia (como en la vida) para mucho. Mi padre soportó con estoicismo también las terroríficas lecciones sobre la vida de los gatos que le obligaba a escuchar a la vuelta del trabajo en mi más tierna infancia (¡exámenes incluidos! ¡Perdón con efecto retroactivo!), y siempre se mostró feliz de celebrar conmigo cada pequeño paso en esta Tierra como si fuera el más importante de todos.

Huelga decir que sin ambos (uno no es hijo sino por coproducción de dos *álguienes*), ni este trabajo ni este servidor habrían visto la luz del sol. Todo lo que soy se lo debo a ellos, sencillamente. Gracias por no ser ni un ápice distintos a como sois, porque dudo mucho que pueda haber mejores mentores que vosotros. Así que gracias, muchas, por todo.

Sí, la genética es implacable, pero uno no es sin su circunstancia, y mi circunstancia son tres hermanas y tres hermanos como seis soles, a los que admiro y de los que he aprendido mucho. Cuando uno es el pequeño de una familia inabarcable quiere ser lo que son todos sus hermanos, cosa por otro lado imposible, pero así pasa uno por querer escribir libros de poesía, fabricar violonchelos, tocar el piano con más de dos dedos, ser capaz de leer la metafísica de Aristóteles en griego, buscar fósiles en montañas remotas o entender la iconografía del Barroco, por ejemplo. Huelga decir que de todo aquello uno aprendió más bien poco, pero la suerte de contar con tantos ejemplos dechados de virtudes es tan

valiosa que ahora no puedo sino abogar por las familias hipernumerosas siempre que tengo ocasión. Finalmente todo aquello cristalizó en la Biología, quizá por equilibrar un poco la rama familiar de Ciencias, ostensiblemente menos poblada, pero que espera con interés el momento en que alguno de mis maravillosos sobrinos se incorpore a ella, ese día temblarán las conversaciones familiares de sobremesa. Aunque la otra rama también espera sus refuerzos y, además, llegarán antes. Oliver el filósofo se prepara para unirse al frente ontológico de Elena y Cristóbal, y que el Cielo nos asista.

Quiero dar las gracias a Susana, mi hermana mayor. Ella me conoce como un tronco a sus ramitas y me ha ayudado a crecer en todos los sentidos. Ha sido siempre un modelo de justicia, y yo solamente puedo esperar estar a la altura. En la casa de Tudescos su cuarto era un refugio lleno de música ante cualquier adversidad, y ella fue la claraboya que me ayudó a caminar sin miedo (pero no de puntillas). De ella aprendí a tener una opinión política (¡y a mantenerla!), a amar la poesía (la primera que conocí fue la suya) y la prosa. Por todo esto, y por mucho más, gracias. A Rafa, que convierte pedazos de madera muerta (no alcanzo a entender cómo es siquiera posible) en instrumentos capaces de estremecer el alma humana. Él fue el primero que se fue lejos, cuando estudiaba en Cremona, y aún hoy sonrío cuando recuerdo que su vuelta siempre era una fiesta. Él es un ejemplo de perseverancia ante la adversidad, tiene una curiosidad contagiosa y por todo eso, también le doy las gracias. Además, es el autor de la acuarela que ilustra la portada de este trabajo, que ahora cuelga en mi biblioteca. A Elena, la filósofa, que me ha enseñado a apreciar el valor del conocimiento como un fin en sí mismo, y me ha acogido con cariño y alegría en horas bajas. Siempre me ha parecido imbatible en la refriega verbal, ¡porque posee más instrumentos dialécticos que el mismísimo Diablo! Nadie ha retado mi pensamiento como ella, y en tándem con Cristóbal son de todo punto invencibles. Por no dejarme languidecer en mi zona de confort mental, a ambos, les doy las gracias. También a Alejandro, el único de los hermanos capaz de comunicar emociones con la música, escapando del bidimensional ámbito de la palabra. Él ha sido, sin saberlo, el que más ha guiado mis pasos hacia la senda del conocimiento científico. De niño, él me enseñó solfeo, las leyes de Newton, cómo convertir el *agua* en *vino*, a fabricar pólvora, y barcos autopropulsados. Me hacía preguntas que estimulaban mi imaginación, imposibles de contestar. Recuerdo vívidamente que una vez me preguntó ¿qué es la masa? Y yo, sabiendo, le contesté algo sobre el peso. Me dijo que no, y me dejó revolver en todos los libros que encontré y dar varias respuestas más hasta darme por vencido. A la postre me confesó que él tampoco lo sabía y, aún peor, que no lo sabía nadie en realidad. Aquello me dejó estupefacto. Y así continué hasta lo del dichoso Bosón de Higgs. ¡Cuando lo entienda bien se lo cuento! Por estimular mi curiosidad, por leerme “De la Tierra a la Luna” y por introducirme en el mundo de la música, le doy las gracias. También a Pol, el geólogo, que lee historias en las piedras y los mapas, y me enseñó a apreciar que hay capas y más capas en las cosas que, por cotidianas, damos por hechas. De él aprendí a introducirme en los remolinos de la informática, cosa sin la que una gran parte de este trabajo habría sido imposible, y también la importancia de aprender idiomas. Él siempre aporta ese punto de sensatez que facilita el abismal paso de la idea a la praxis, una cualidad que trato de copiar en el día a día. Con él salí del país por primera vez y vi otros sitios y otras gentes, y por todo, le doy las gracias. Y a Mónica, la más joven (mejorando lo presente) de los hermanos que me enseñó a apreciar el arte como expresión y no como copia imperfecta, y tiene una alegría que desborda, nos empapa y contagia en cada ocasión. Tanto que, si no está, su vacío se nos hace tangible y el resto nos miramos, desconcertados.

Ella me ha ayudado a enfrentarme a muchos retos reforzando sutilmente mi confianza, y por todo ello, también, le doy las gracias.

Por supuesto también a Juanma, porque el mundo y sus castillos siguen estando de más, por su alegría incondicional y compartida, por su apoyo a todos los niveles (mundanos y espirituales), por los madrugones y las carreteras nocturnas, porque gracias a él volver es una fiesta... Porque si esto merece la pena es a la luz de su mirada. Por todo lo que escribo y por lo que callo, por todo, gracias. Y gracias también a Marimar y a Pablo, por celebrar las alegrías y empujarme las penas, por su ayuda y su acogida; a Milagros y Juan, que siempre están ahí si es necesario, por su ayuda y su cariño, a todos, gracias.

Agradezco también la confianza que Andrés Hidalgo (el director de este trabajo y este doctorando) depositó en mí cuando me incorporé a su equipo. Ha sido un honor y una aventura apasionante embarcarme en este proyecto, que me ha regalado algunas de las más grandes alegrías. De él he aprendido una cantidad extraordinaria de cosas, y creo, sinceramente, que no he podido tener mejor mentor para desarrollar ese juicio crítico que tanto empeño pone en transmitir, ni mejor ejemplo de genuina pasión por la ciencia. Por todo, le doy las gracias. Ahora solo espero estar a la altura allá donde me lleven mis pasos.

También quiero darle las gracias a Teresa Suárez, que confió en mí en mi anterior etapa, y que me enseñó todo lo que sé de biología molecular y de mis más simpáticas amigas ¡las amebas! Fue una época difícil y ella tuvo la bondad y la paciencia de apoyarme y de ayudarme enormemente, y sin ella, no me cabe duda, no estaría escribiendo estas palabras hoy aquí, así que le debo todo esto también a ella, y por eso, Tere, ¡muchas, muchas gracias!

¡Y por supuesto a María Casanova! Porque ella me ha enseñado casi todo lo que sé acerca de los neutrófilos, y cómo trabajar con ellos. Sin ella nada de esto habría sido posible. Y esto vale también en sentido literal, porque este trabajo parte de las conclusiones del suyo, ¡así que partió a hombros de gigantes! Gracias por enseñarme con paciencia y por discutir conmigo los datos. Por tus consejos y tu ejemplo ¡muchas gracias! También a Linnea Weiss, que tiene la coproducción de mi aprendizaje. Ella me enseñó (y yo estaba muerto de nervios) a coger ratones sin perder dedos, a operar y cuidar a “mis pacientes” cuando aprendí algunas técnicas quirúrgicas, y todo con una pasmosa habilidad que hacía que todo fuera sencillo. Con ella comencé a coger cariño a los ratones CXCR2<sup>-/-</sup>, que son el origen de este proyecto, aprendí toda clase de técnicas, y traté de imbuirme de su pasión investigadora. Por todo, ¡muchas gracias!

¡Sin olvidar, pardiez, todo lo que he aprendido de otros miembros del labo! Ha sido a lo largo de los años un grupo de lo más simpático, que hacía que trabajar allí fuera una alegría. Georgiana Crainiciuc ha sido la mejor compañera que uno puede esperar tener en un laboratorio, porque es dueña de una alegría contagiosa que hace llevaderos los circadianos ¡y lo que haga falta! Si este trabajo está viendo ahora la luz es, sin duda, en coproducción con ella, no puedo ni empezar a enumerar todas las cosas en las que me ha ayudado. Y sobre todo tiene la extraordinaria cualidad de hacer que los días en el laboratorio sean más felices, más humanos. Ahora, eso sí, cuidadito con dejar descolocado su microscopio intravital ¡que por algo se ganó el apelativo de “Furia de los Balcanes”! Por todo, Geo, ¡muchas muchas gracias!. Y Noelia Alonso ha sido todo este tiempo la otra parte de esa alegría, por su forma de ser y porque canta en el *bench* mientras trabaja (¿seguirá cantando coplas allí en Alemania?). He aprendido mucho de ella, y me ha ayudado a refinar los experimentos. Eso, y además te descubría la más mínima inconsistencia en los *lab meetings*, pardiez, con



ojo incisivo y dedo acusador, cosa que le agradezco enormemente, porque me ayudó mucho, sin saberlo, a aprender a pensar. Por eso, y por todo lo que me ha enseñado, le doy las gracias. Y a Juan Antonio Quintana, que también me ha ayudado enormemente, y siempre se anticipa con no sé qué clase de capacidad extrasensorial a lo que puedas necesitar. Porque siempre se puede contar con él y sabe hacer toda clase de cosas inverosímiles (¡hasta tiene una certificación oficial de maestro pipetero!), y por todo eso, le doy las gracias. A Magda Leiva, por su cariño, sus consejos y su ayuda, que ha sido mucha (¡y el BrdU!). También quiero dar las gracias a Ángel Nicolás, que está llevando adelante un proyecto estupendo, que tiene la cualidad de la franqueza y no rehuye una discusión sobre resultados, que siempre es fructífera. A Diego, por su ayuda con los westerns salidos del infierno, porque idolatra y teme (a partes iguales) a los microneutros tanto como yo, y sobre todo porque ha llegado en poco tiempo a amar la microscopía intravital, que tantas alegrías espero que le reporte en el futuro. A Itziar, compañera de circadianos, que ha tenido que volver a empezar pero lo ha hecho con fuerzas renovadas, porque es alegre y cabal, y no me cabe duda de que sacará adelante un estupendo proyecto. También a Sandra, Marianna, Arturo, Iván y Jackson, porque han sido unos compañeros estupendos. A todos, ¡muchas gracias!

Y, déjenme que lo confiese, nada de lo que hemos hecho habría sido posible sin Inés Ortega, que cuida mejor que nadie de la colonia y, además, te recibe con alegría en SPF cada vez. Es un lujo contar con ella en nuestro día a día, y por eso quiero darle las gracias. Y ese agradecimiento es extensible a Eva Santos, que también ha sido una ayuda inestimable.

También quiero agradecer el apoyo de la fantásticas unidades técnicas del CNIC, porque nos ayudan constantemente y hacen que nuestro trabajo sea mucho más eficiente. A Jose Ligos, porque sin su ayuda la citometría espectral para mí seguiría siendo una cuestión esotérica, cosa de brujas. También a Mariano Vitón, por su ayuda, y a Raquel Nieto y Elena Prieto por su paciencia con los sortings. En general a toda la Unidad de Celómica, ¡gracias por todo! Y gracias también a la Unidad de Microscopía, especialmente a Verónica Labrador y Elvira Arza, por enseñarme a manejar esos equipos que tantas alegrías me han dado. A la unidad de Genómica y a la de Bioinformática, por su ayuda con el RNAseq y análisis posterior sobre todo a Manuel José Gómez y a Fátima Sánchez. Por supuesto, también tengo que agradecer a la Unidad de Medicina Comparada y al Servicio de Bioseguridad por su apoyo técnico.

No puedo olvidar la inestimable ayuda de los diversos grupos con los que hemos colaborado para hacer realidad este trabajo: Carlos del Fresno y David Sancho (CNIC); Mónica Gómez, Jaime García y Borja Ibáñez (CNIC); María Isabel Cuartero y María Ángeles Moro (Facultad de Medicina, UCM); Shu Zhen Chong, Maximilien Evrard y Lai Guan Ng (Singapore Immunology Network, A\*Star); Jorge López, Francisco Abad y Cecilia Santos (Hospital de la Princesa). Y, por supuesto, a todos los colaboradores que han contribuido con animales o reactivos esenciales para este trabajo: Christian Weber, Agnes Görlach, Nancy Hogg y Salvador Aznar.

Agradezco también las sugerencias de Maria Teresa Portolés, mi cotutora académica de la Universidad Complutense de Madrid. También su esfuerzo de corrección, porque ha hecho más legible este trabajo en su conjunto.

Finalmente, agradezco al Ministerio de Economía, Industria y Competitividad la financiación que me ha permitido dedicarme a este proyecto.

TESIS DOCTORAL

Papel homeostático e inflamatorio de  
**neutrófilos senescentes**

José M. Adrover Montemayor

Dirigida por: Dr. Andrés Hidalgo Alonso

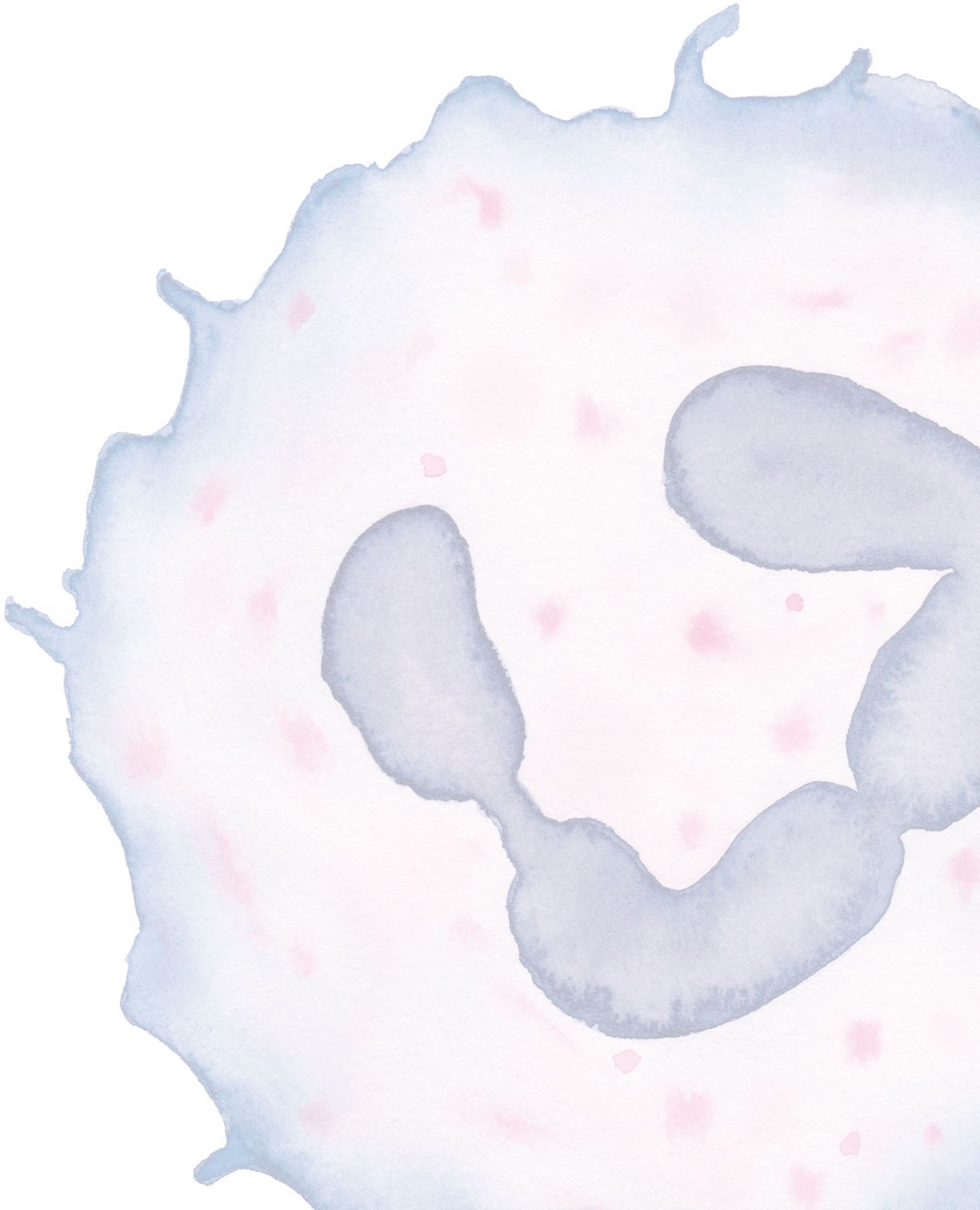


# Índice

1. Resumen / Abstract.....	15
1.1. Resumen.....	17
1.2. Abstract .....	19
2. Introducción.....	21
2.1. Inmunidad.....	23
2.2. Los neutrófilos.....	25
2.2.1. Repertorio principal de receptores .....	26
2.2.2. Producción de neutrófilos: la granulopoyesis.....	29
2.2.3. Movilización de neutrófilos desde la médula ósea .....	31
2.2.4. Cascada de reclutamiento de los neutrófilos .....	34
2.2.5. Proceso de envejecimiento de los neutrófilos .....	39
2.2.6. Eliminación de los neutrófilos de circulación .....	43
2.2.7. Los neutrófilos en defensa e inflamación.....	44
2.3. Aspectos temporales de los neutrófilos .....	48
2.3.2. Cronobiología: ritmos circadianos e inmunidad .....	50
2.3.3. La interfaz mundo físico – organismo .....	50
2.3.4. El reloj molecular.....	51
2.3.5. Ritmos circadianos en los neutrófilos .....	54
3. Objetivos .....	55
3.1. Objetivos .....	57
4. Resultados .....	59
4.1. Análisis del proceso de envejecimiento de los neutrófilos.....	61
4.1.1. El envejecimiento de los neutrófilos es un proceso temporalmente regulado ....	61
4.1.2. Implicación de receptores de quimioquinas en el envejecimiento.....	64
4.1.3. Generación de modelos genéticos de envejecimiento .....	67
4.1.4. El envejecimiento es un programa transcripcional global en neutrófilos.....	70
4.1.5. Cxcr4 antagoniza el envejecimiento de neutrófilos .....	71
4.1.6. El envejecimiento de neutrófilos es independiente del microbioma .....	72
4.1.7. El envejecimiento de neutrófilos no requiere la producción de ROS .....	74
4.1.8. Envejecimiento de neutrófilos en humanos.....	75

4.2. Envejecimiento del neutrófilo y eliminación homeostática de la circulación.	77
4.3. Consecuencias del envejecimiento de los neutrófilos.....	80
4.3.1. Contribución de neutrófilos frescos y envejecidos en inflamación estéril.....	81
4.3.2. Alteraciones de rodamiento y reclutamiento en neutrófilos envejecidos .....	84
4.3.3. Mecanismos de la deficiencia de rodamiento de neutrófilos envejecidos .....	87
4.3.4. Reclutamiento dependiente e independiente de selectinas .....	89
4.4. Papel de neutrófilos frescos y envejecidos en modelos de enfermedad.....	92
4.4.1. Modelos de infección .....	92
4.4.2. Modelos de inflamación vascular .....	96
5. Discusión.....	101
5.1. El mecanismo del envejecimiento de los neutrófilos.....	104
5.2. Migración homeostática y defensa circadiana en tejido.....	107
5.3. Migración como respuesta a estímulos inflamatorios.....	108
5.4. Papel de los neutrófilos envejecidos en el daño vascular .....	109
5.5. Actividad diurna, inmunidad circadiana y el ajuste evolutivo.....	110
5.6. Posibles funciones de neutrófilos envejecidos en tejidos .....	112
5.7. Consideraciones finales y perspectivas de futuro .....	114
6. Conclusiones .....	115
7. Materiales y métodos.....	119
8. Referencias .....	143
9. Anexos.....	163
9.1. Abreviaturas .....	165
9.2. Publicaciones.....	167
9.3. Rutas bioquímicas diferencialmente expresadas entre ZT5 y ZT13.....	168
9.4. Huella transcriptómica de neutrófilos frescos y envejecidos .....	176

# 1. Resumen / Abstract







## 1.1. Resumen

Los neutrófilos son los leucocitos más abundantes en la circulación humana y representan la primera barrera de defensa contra microorganismos patógenos. Su número en circulación muestra un comportamiento temporalmente oscilatorio, con una periodicidad circadiana. Son células con una vida corta, en el rango de horas desde que salen de la médula ósea hasta que son eliminadas de la circulación (*clearance*). En ese lapso de tiempo sufren un proceso conocido como envejecimiento que provoca cambios fenotípicos en varios marcadores de superficie y precede en el tiempo a la fase de *clearance*. Así, durante el día los neutrófilos muestran un fenotipo esencialmente “envejecido” (también llamado senescente) y durante la noche un fenotipo “fresco”.

En este trabajo hemos analizado este proceso de envejecimiento de los neutrófilos en ratones y demostramos que está controlado por el reloj molecular y la señalización de dos receptores de quimioquinas, CXCR2 y CXCR4, que funcionan de manera antagónica. Hemos analizado el proceso transcriptómicamente y demostramos que se trata de un programa transcripcional global que afecta a gran cantidad de rutas bioquímicas y dota de propiedades específicas a los neutrófilos. Para estudiar éstas en detalle hemos generado y caracterizado ratones mutantes específicamente en neutrófilos para los genes que regulan el envejecimiento.

Primero, demostramos que los neutrófilos frescos tienen mayor capacidad de migración hacia los tejidos inflamados que los envejecidos. Esto se debe a que, a medida que envejecen, sufren cambios en su microanatomía cortical que provocan una reducción de su capacidad de rodamiento sobre el endotelio vascular, el primer paso para el reclutamiento hacia los tejidos inflamados. Consecuentemente, encontramos que la presencia aberrante de neutrófilos frescos en circulación provoca un aumento del daño inflamatorio en un modelo de infarto cerebral por isquemia.

Por otro lado, demostramos que el envejecimiento de los neutrófilos es necesario de para su eliminación homeostática de la circulación, un proceso que permite el movimiento de neutrófilos hacia los tejidos durante la fase de *clearance*. Analizando nuestros ratones

mutantes y ratones silvestres (WT) a distintos tiempos demostramos que esta infiltración circadiana de tejidos anticipa y fortalece la defensa frente a infección por *Candida albicans* durante la noche. Sin embargo, la presencia excesiva y constante de neutrófilos envejecidos en los tejidos puede provocar daño en el contexto de sepsis bacteriana.

La presencia de neutrófilos envejecidos en circulación puede provocar, además, daño vascular en condiciones de activación patológica. Es el caso del infarto de miocardio, en el que mostramos que la presencia de neutrófilos envejecidos en circulación durante procesos de isquemia y reperfusión compromete la supervivencia, y que esto correlaciona con la formación de trombos diseminados intravasculares.

Este trabajo propone que el sistema inmune ha desarrollado un sistema dinámico de regulación basado en fluctuaciones circadianas. Este sistema oscilatorio permite compartimentalizar temporal y espacialmente a los neutrófilos gracias al proceso de envejecimiento, y de esta manera asegura la defensa de tejidos a la vez que previene el daño inflamatorio de la vasculatura.

## 1.2. Abstract

Neutrophils are the most abundant leukocytes in human circulation, and the first line of defense against pathogens. Their numbers follow a circadian pattern of oscillation in blood. They are short-lived, with lifetimes in the range of hours from the time they leave the bone marrow to the moment they are removed from blood (clearance). In the time they spend in the circulation neutrophils undergo a process of “aging” that promotes phenotypic changes on several surface markers and precedes the clearance phase: during the day neutrophils show an “aged” (also called senescent) phenotype and during the night a “fresh” phenotype.

In this work we have analyzed this process of neutrophil aging in mice and we show that it is controlled by both the molecular clock and antagonistic signaling of two chemokine receptors: CXCR2 and CXCR4. We performed mass RNA sequencing, and found that this process is a global transcriptional program that affects several biochemical pathways and endows neutrophils with specific properties. To study these properties in detail we generated and characterized mice with neutrophil-specific deficiencies in genes that control the process of aging.

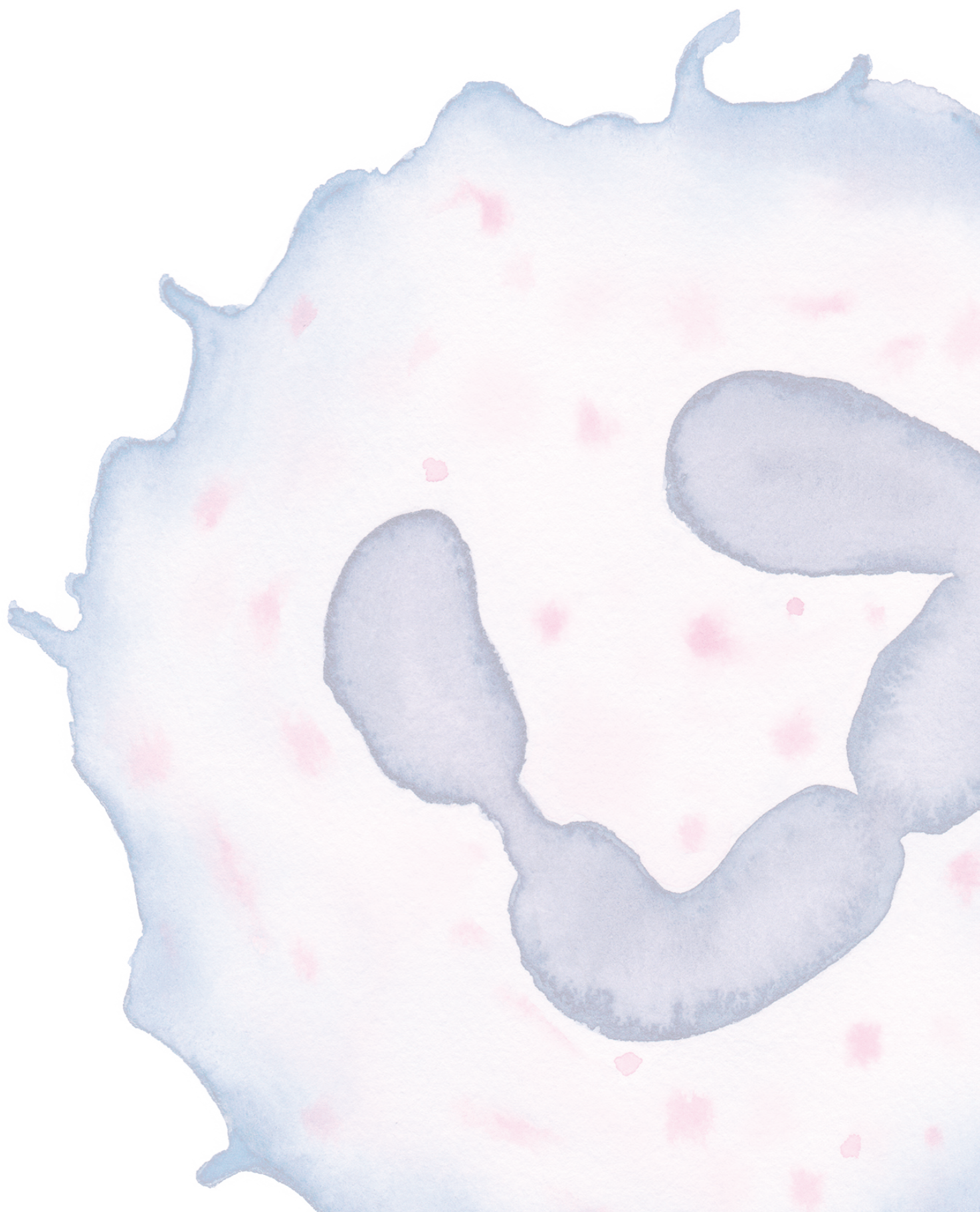
First we show that fresh neutrophils have better migration efficiency to inflamed tissues than aged neutrophils. This is due to changes in the microanatomy of the cell that cause a reduction in their capability to roll on the vascular endothelium, which is the first step on their recruitment to the inflamed tissues. Consequently, we find that aberrant presence of fresh neutrophils in circulation aggravates inflammatory damage in a model of ischemia-induced cerebral infarct.

On the other hand, we show that neutrophil aging is required for the homeostatic elimination of these cells from circulation, a process that allows the migration of neutrophils into tissues during the clearance phase. By analyzing our mutant and control mice at different times we show that this circadian infiltration of tissues enhances the defense against infection by *Candida albicans* at night. However, the excessive and continued presence of aged neutrophils in tissues can also induce damage in the context of bacterial sepsis.

The presence of aged neutrophils in the circulation can also produce vascular damage during pathological activation. This is the case of myocardial infarction, in which we show that aged neutrophils worsen survival in a neutrophil-dependent manner. We find that these correlate with the formation of intravascular thrombi during ischemia/reperfusion injury.

We conclude that the immune system has developed a dynamic regulation system based on circadian fluctuations. This oscillatory system allows a temporal and spatial compartmentalization of neutrophils that is enabled by their aging process, and ensures circadian defense in tissues while at the same time preventing the presence of circulating neutrophils that can cause vascular damage.

## 2. Introducción







## 2.1. Inmunidad

La palabra **inmune** se toma del latín *immunis*, ‘exento de servicio’, ‘libre de carga’, procedente del prefijo de negación *-im* y *mun-is* (de *munus*=carga o servicio público) que se refería a la exención de los senadores romanos (entre otros estamentos) de prestar ciertos servicios públicos y de pagar ciertos impuestos (Corominas & Pascual 1996). En el sentido que nos atañe, actualmente la palabra inmune quiere decir “no atacable por ciertas enfermedades”, según la Real Academia Española. En las ciencias biomédicas, el término **inmunidad** (que incluye el sufijo *-dad*, ‘cualidad’) se refiere a las barreras físicas, sistemas celulares y procesos fisiológicos que tratan de evitar que un organismo sea invadido por otros organismos. Para ello diferenciamos todo un conjunto de células, tejidos y moléculas que colectivamente reciben el nombre de **sistema inmune**, que es el que, en última instancia, se encarga de otorgar inmunidad al sujeto coordinando la **respuesta inmune**.

La inmunidad es una de las propiedades esenciales de todos los organismos y, como tal, tiene un origen remoto desde el punto de vista evolutivo (Medzhitov 2008) y una gran capacidad de adaptación para hacer frente a la carrera armamentista entre patógenos y huéspedes. Ya en los albores de la multicelularidad tenemos constancia de células que ejercen una función de vigilancia inmune, como el caso de las células *S* (de *sentinel*, centinela en inglés) de la ameba social *Dictyostelium discoideum* (Chen et al. 2007), a medio camino entre el mundo unicelular y pluricelular, del que entran y salen en función de sus necesidades. En los organismos superiores, no obstante, la respuesta inmune es altamente sofisticada, y tiene dos grandes ramas diferentes pero altamente interconectadas: la inmunidad innata y la inmunidad adquirida o adaptativa.

La **inmunidad adaptativa** es la que produce los más famosos componentes de la inmunidad humoral, los anticuerpos. Actúa más lentamente pero, a cambio, es capaz de adaptarse a antígenos concretos y de generar memoria contra ellos, de tal manera que una exposición subsecuente tenga una respuesta más eficaz, lo que conforma la base de la vacunación. Si bien la respuesta innata no es específica, la respuesta adaptativa sí lo es, y es capaz de producir anticuerpos específicos contra patógenos particulares, aunque en condiciones patológicas también frente a autoantígenos en las enfermedades autoinmunes.

o contra antígenos no patogénicos en las alergias. Se acepta que la inmunidad adaptativa es un “descubrimiento” evolutivo más reciente, restringido casi totalmente a los vertebrados, aunque no exclusivamente ([Kaufman 2010](#)). Sus células principales son los linfocitos T y B, siendo éstos últimos los responsables de la generación de anticuerpos específicos.

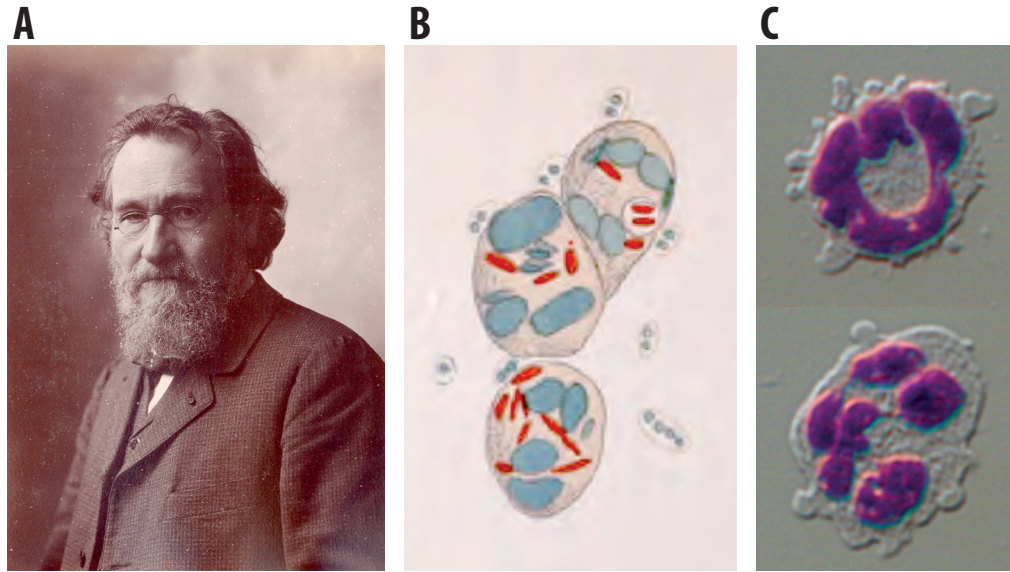
La **inmunidad innata** es evolutivamente anterior y, a grandes rasgos, se especializa en la detección de patrones conservados en los agentes infecciosos, lo que permite su identificación y una respuesta muy rápida (en el rango de minutos a horas) contra ellos. Es la primera barrera celular de defensa del organismo, y su activación es necesaria para que pueda darse inmunidad adquirida ([Abbas et al. 2014](#)). Las principales células del sistema inmune innato son los neutrófilos, macrófagos, células asesinas naturales (NK, por sus siglas en inglés), células dendríticas, monocitos, mastocitos, basófilos, eosinófilos y las células linfocíticas innatas ([Spits & Di Santo 2011](#)). El objeto principal del presente trabajo son los neutrófilos que, como veremos más adelante, en humanos son los más numerosos en sangre de entre todas las células del sistema inmune. La respuesta innata es capaz de hacer frente a organismos patógenos de manera instantánea; no necesita ninguna clase de entrenamiento como sí ocurre con la inmunidad adaptativa, y tiene una base genética. La inmunidad innata utiliza receptores que reconocen patrones moleculares derivados de microorganismos (pero no de organismos superiores) que se llaman PAMPs (de *pathogen associated molecular patterns*, patrones moleculares asociados a patógenos) o moléculas que indican daño a los propios tejidos, los DAMPs (de *damage associated molecular patterns*, patrones moleculares asociados a daño), y su primera función es la fagocitosis de microorganismos ([Abbas et al. 2014](#)). Ilya Ilyich Metchnikov (1845-1916, **Figura 1A**) describió y analizó el comportamiento de los macrófagos y los neutrófilos (que él denominaba micrófagos), y descubrió que la fagocitosis de los microorganismos exógenos (**Figura 1B**) era una respuesta programada y esencial para la inmunidad, llegando a la conclusión de que la inflamación no era algo patológico, sino más bien al contrario, una respuesta inmune frente a una agresión externa que busca precisamente recuperar el estado homeostático basal ([Metchnikoff 1893](#)). Su experimento más famoso consistió en insertar una espina de rosal en una larva de estrella de mar, que es translúcida, y observar mediante un microscopio el agolpamiento de células procedentes de la hemolinfa alrededor de ella ([Wintrobe & Greer 2009](#)). Este es uno de los más tempranos y esclarecedores experimentos utilizando lo que hoy llamaríamos técnicas de microscopía intravital (es decir, la observación del comportamiento de las células en el interior de un organismo vivo gracias a un microscopio). Para Metchnikov, la inmunidad estaba mediada fundamentalmente por células fagocíticas, pero esta inmunidad celular de Metchnikov chocaba con las tesis de Paul Ehrlich (1854-1915), defensor de la llamada inmunidad humoral, que postulaba que los anticuerpos y otras moléculas disueltas en los humores corporales eran los verdaderamente responsables de la inmunidad ([Moticka 2015](#)). Tras toda clase de amargas disputas, el premio Nobel de 1908 les fue otorgado a ambos pues, en última instancia, ambos tenían razón. Metchnikoff, hoy día, es reconocido como el padre del estudio de la inmunidad innata.



## 2.2. Los neutrófilos

Cuando los primeros hematólogos como William Hewson miraron la sangre bajo sus microscopios, la diferenciación más evidente resultó entre células que eran de color rojo (eritrocitos, del gr. ἐρυθρός ‘rojo’, y κύτος ‘bolsa’) y células que no tenían ningún color y por tanto aparecían como pequeñas esferas blancas en el ocular (leucocitos, del gr. λευκός ‘blanco’ y κύτος ‘bolsa’). Con el advenimiento de las tinciones histológicas a mediados del siglo XIX, fue posible la distinción de más clases de células en la sangre en función de su morfología nuclear (serie mononuclear, serie polimorfonuclear, etc.). En 1896, Paul Mayer desarrolló la tinción de hematoxilina (pigmento básico) y eosina (pigmento ácido) que permitió diferenciar, aún más clases de aquellos misteriosas células “blancas”, entre las cuales se encuentran los neutrófilos (**Figura 1C**). Éstos recibieron ese nombre porque sus gránulos (de los que hablaremos más adelante) no se tiñen ni con pigmentos ácidos ni básicos, lo que los distingue con facilidad de los basófilos y eosinófilos, cuyos gránulos se tiñen con hematoxilina y eosina, respectivamente.

Los neutrófilos son los leucocitos más abundantes en circulación humana, y son la principal línea de defensa del organismo frente a patógenos ([Kolaczowska & Kubes 2013](#)). Como describió Metchnikov son, junto a los macrófagos, las células fagocíticas profesionales por excelencia. En circulación son esféricos, de unas 10-12 micras de diámetro, y poseen numerosas proyecciones membranosas llamadas microvellosidades. En los tejidos o sobre el endotelio vascular tienen una morfología ameboide, con pseudópodos que permiten su movimiento. Su núcleo es polimórfico (de ahí el término polimorfonucleares) y está lobulado ([Gómez-Álvarez 2007](#)). Presentan gran cantidad de **gránulos** intracelulares que contienen potentes péptidos antimicrobianos y enzimas proteolíticas con una alta capacidad citotóxica, cuya principal función es la destrucción de microorganismos invasores pero que también contribuyen a dañar el tejido sano en condiciones de activación patológica ([Borregaard et al. 2007](#)).



**Figura 1.** A) Fotografía de Ilya Metchnikov (Archivo del Institut Pasteur, París) B) Dibujos originales de Metchnikov de tres neutrófilos fagocitando bacilos de *Proteus*, tomada de (Metchnikov 1905) C) Dos fotografías de microscopía óptica de neutrófilos de ratón teñidos con hematoxilina y eosina en los que se aprecia el núcleo lobulado.

Los neutrófilos son capaces de detectar la presencia de patógenos en los tejidos. Pueden hacerlo directamente si se encuentran en los tejidos mismos, o pueden detectar señales inflamatorias del endotelio vascular mientras están en circulación. Esta activación del endotelio es promovida por los macrófagos residentes en los tejidos que detectan la presencia de organismos patógenos y producen mediadores proinflamatorios. Los neutrófilos son capaces de reducir su velocidad respecto al flujo sanguíneo y detenerse sobre el endotelio, para salir del vaso hacia el tejido dañado. Una vez en él, utilizan gradientes de diversas citoquinas, quimioquinas, PAMPs o DAMPs para dirigirse hacia los microorganismos invasores y eliminarlos por fagocitosis o utilizando su repertorio citotóxico. Para poder ejercer estas funciones, los neutrófilos necesitan la presencia de múltiples receptores que les permitan detectar y responder en base a las señales del medio extracelular.

### 2.2.1. REPERTORIO PRINCIPAL DE RECEPTORES

Como célula del sistema inmune, los neutrófilos deben ser capaces de detectar y responder a una gran cantidad de estímulos. Para ello están dotados de gran cantidad de receptores que les otorgan capacidad innata de detectar microorganismos invasores. Éstos incluyen los receptores de reconocimiento de patrones o PRRs por sus siglas en inglés y otros, como los receptores Fc que reconocen anticuerpos unidos a sus antígenos y enlazan con la respuesta adaptativa. Poseen también otros receptores que detectan el microambiente inflamatorio y que les permiten migrar hacia esas zonas para ejercer su función inmune (Futosi et al. 2013). En términos generales, poseen receptores de siete segmentos transmembrana acoplados a proteínas G (GPCRs), receptores Fc, moléculas de adhesión (integrinas, selectinas o sus ligandos), receptores de citoquinas, y receptores de patrones innatos. Para una lista no exhaustiva véase la **Tabla 1**.

Receptores acoplados a proteínas G	Receptores Fc	Moléculas de adhesión	Receptores de citoquinas	Receptores de la inmunidad innata
Receptores formil-péptido (FPR): FPR1, FPR2 y FPR3	Fc $\gamma$	Selectinas y ligandos: L-Selectina (CD62L), PSGL1, CD44, ESL-1	Receptores de citoquinas tipo I: IL4-R, IL-6R, IL-12R, IL-15R, G-CSFR, GM-CSFR	Receptores tipo Toll: TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9
Receptores de quimioatrayentes clásicos: BLT1, BLT2, PAFR, C5aR	Fc $\alpha$	Integrinas: LFA-1 ( $\alpha$ 1 $\beta$ 2), Mac-1 ( $\alpha$ M $\beta$ 2), VLA-4 ( $\alpha$ 4 $\beta$ 1)	Receptores de citoquinas tipo II: IFNAR, IFNGR, IL-10R	Lectinas tipo C: Dectin-1, Minicle, MDL-1, Mcl, CLEC-2
Receptores de quimioquinas: CXCR1, CXCR2, CXCR4, CCR1, CCR2	Fc $\epsilon$		Familia del receptor IL-1R: IL-1RI, IL-1RII, IL-18R	Receptores tipo NOD: NOD2, NLRP3
			Familia TNFR: TNFR1 (p55), TNFR2 (p75), Fas, LT $\beta$ R, RANK, TRAIL-R2, TRAIL-R3	Receptores tipo RIG: RIG-1, MDA5

**Tabla 1:** Principales receptores en los neutrófilos. Modificado de (Futosi et al. 2013)

Por la importancia que tendrán posteriormente en este trabajo, veamos con más detalle algunos de estos receptores: CXCR2, CXCR4, integrinas y selectinas.

Los **receptores de quimioquinas** son una clase especial de receptores con siete segmentos transmembrana acoplados a proteínas G (GPCRs por sus siglas en inglés) que consisten de una subunidad  $\alpha$  y un complejo  $\beta\gamma$ . En cuanto a proteínas G, los neutrófilos expresan miembros de las familias Gs, Gi y Gq, siendo ésta última la familia más importante, porque incluye la proteína G $\alpha$ i que media la señalización por receptores de quimioquinas (Stadtman & Zarbock 2012). La unión de una quimioquina a su receptor promueve distintas respuestas como la adhesión, migración y quimiotaxis (el movimiento direccional provocado por una sustancia atrayente), activación de integrinas y cambios a nivel de citoesqueleto (Baggiolini et al. 1993). En términos generales, al disociarse la proteína G del receptor, su subunidad  $\alpha$  inhibe la adenilato ciclasa (AC) provocando una caída de los niveles de AMP cíclico (cAMP por sus siglas en inglés), mientras que el complejo  $\beta\gamma$  activa la kinasa PI3K $\gamma$  (Servant et al. 2000), que cataliza la formación de fosfatidil-inositol trifosfato o PIP3. También activa las isoformas  $\beta$ 2 y  $\beta$ 3 de la fosfolipasa C (PLC), que pro-

duce inositol-trifosfato (IP3), un agente movilizador de calcio, y diacilglicerol (DAG), que activa a la proteína quinasa C (Stadtman & Zarbock 2012).

De especial interés para este trabajo es el receptor **CXCR2** (también conocido como receptor de interleukina 8 beta, IL-8RB), que une quimioquinas de tipo C-X-C, que tienen gran relevancia en el tráfico inmune. Éstas tienen bajo peso molecular y cuatro cisteínas conservadas, estando las primeras dos separadas por un único aminoácido. CXCR2 es uno de los receptores más importantes para la biología del neutrófilo (McDonald & Kubes 2010). Su principal ligando en ratones es **CXCL1** (también conocido como KC), aunque también une CXCL2. CXCL1 es un potente atractor para la quimiotaxis de los neutrófilos y es crítico para su migración hacia puntos de inflamación (Eash et al. 2010). La señalización a través de CXCR2 juega también un papel promoviendo la salida de los neutrófilos desde la médula ósea hacia el torrente sanguíneo, como se discute más adelante en el apartado de movilización. Adicionalmente, CXCR2 está implicado en la activación de procesos de senescencia celular, un proceso irreversible que sufren algunos tipos celulares como los fibroblastos y algunas células tumorales (Acosta & Gil 2009), que implica la detención del crecimiento, cambios en la cromatina, activación de distintos programas transcripcionales y que altera tanto la morfología como el comportamiento de la célula senescente (Acosta et al. 2008). Se especula que procesos similares puedan darse en, o afectar a, algunas células del sistema inmune como los macrófagos, células NK, células B o células T (Vicente et al. 2016).

Otro receptor de la misma familia es **CXCR4**, el receptor para el factor derivado de células estromales 1 $\alpha$  (SDF-1), también conocido como **CXCL12**. CXCL12 está constitutiva y ubicuamente expresado en la mayoría de los tejidos, a diferencia de otras quimioquinas que, por norma general, se expresan en estados inflamatorios (Zernecke et al. 2008). Es crucial para el anidamiento (*engraftment*), movilización y homeostasis de las células progenitoras en los nichos hematopoyéticos de la médula ósea (Lapidot & Petit 2002) y tiene un papel prominente en la biología y el mantenimiento de las células madre hematopoyéticas (Kiel & Morrison 2006; Morrison & Scadden 2014). En el caso de los neutrófilos, se ha descrito su importancia inhibiendo la movilización desde la médula hacia la circulación y promoviendo su retorno desde la sangre hasta la médula, como se detalla más adelante.

Entre las **moléculas de adhesión celular** de los neutrófilos, las integrinas de la familia  $\beta 2$  (CD11/CD18, como Mac-1) y las selectinas (como la L-selectina o CD62L) y sus ligandos (por ejemplo PSGL-1, ESL-1 o CD44 (Hidalgo et al. 2009)) juegan un papel prominente en el reclutamiento de los leucocitos hacia puntos de inflamación. Las **integrinas** son críticas para el reclutamiento de los neutrófilos a zonas inflamadas, como veremos en el apartado de reclutamiento. Son glicoproteínas heterodiméricas transmembrana formadas por dos subunidades ( $\alpha$  y  $\beta$ ) unidas no covalentemente (Mócsai et al. 2015). En neutrófilos, como en otros leucocitos circulantes, en estado basal las integrinas se encuentran en un estado inactivo, incapaces de unir ligandos hasta que la célula recibe señales de activación por otras vías (señalización por quimioquinas o citoquinas, por ejemplo), lo que produce su activación; éste es un control desde el interior celular hacia la integrina expuesta al exterior, o *inside-out signaling*. Tras la unión de su ligando se produce una respuesta de fuera hacia dentro (*outside-in signaling*) que promueve la adhesión firme de la célula al endotelio (Langereis 2014). Esto se discutirá con más detalle en la sección de movilización.



Las **selectinas** son glicoproteínas transmembrana de cadena sencilla que reconocen carbohidratos fucosilados y sialilados (Sperandio et al. 2009), normalmente unidos a lípidos o a otra proteína transmembrana, que en conjunto constituyen el ligando de selectina. Las selectinas median interacciones débiles y transitorias entre los neutrófilos y la pared endotelial, muy importantes en los primeros pasos de la cascada de reclutamiento de los leucocitos (Futosi et al. 2013). De las tres selectinas (P, inicialmente descrita en plaquetas; E, presente en el endotelio; y L, presente en los leucocitos), la L-selectina es la que se expresa en leucocitos, incluidos los neutrófilos. Los neutrófilos también expresan **ligandos** de selectinas P y E como PSGL-1, CD44 o ESL-1, que tienen glicosilaciones post-traduccionales modificadas con tetrasacáridos sialil-Lewis x y sus isómeros, llevadas a cabo por enzimas fucosiltransferasas y sialiltransferasas, entre otras (Lowe 2003). La P-selectina se expresa en plaquetas, y células endoteliales. En el endotelio se encuentra presintetizada en los cuerpos de Weibel-Palade, lo que permite una movilización rápida a la superficie celular (McEver 2015). Por contra, la E-selectina se expresa en el endotelio solo en condiciones inflamatorias. Todas juegan un papel clave en la respuesta inflamatoria al favorecer el reclutamiento de los neutrófilos y otros leucocitos a la zona donde se produce el daño (Raffler et al. 2005).

De la importancia de las moléculas de adhesión para la defensa inmune dan cuenta las deficiencias de adhesión leucocítica o LADs (de *leukocyte adhesion deficiencies*), una serie de inmunodeficiencias humanas causadas por mutaciones en alguna de estas moléculas, y que discutiremos en el apartado de neutrófilos en defensa e inflamación.

### 2.2.2. PRODUCCIÓN DE NEUTRÓFILOS: LA GRANULOPOYESIS

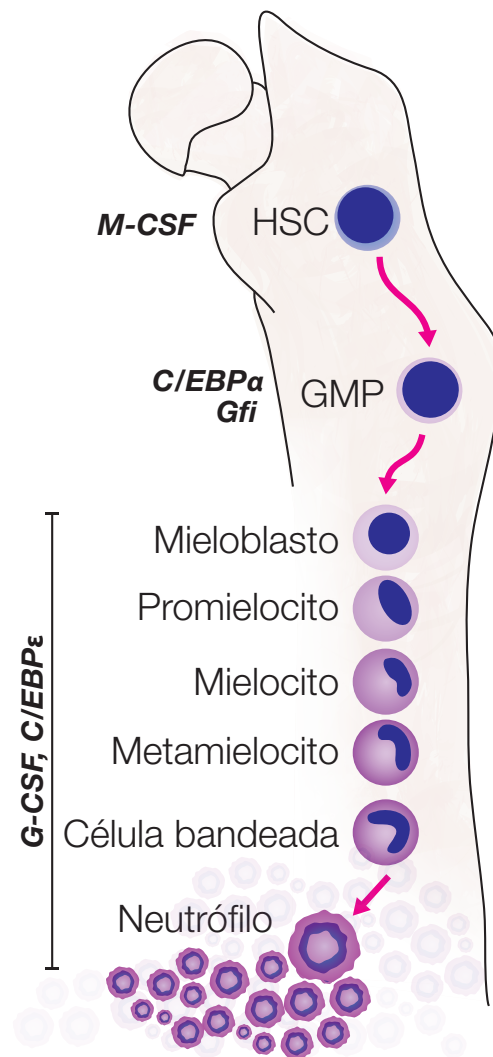
Los neutrófilos, pese a ser las células inmunes más abundantes en la sangre, tienen una vida muy corta en circulación, de 7-10 horas en humanos, y de 11h en ratones (Vielinghoff & Ley 2008). Esta breve vida circulante se interpreta como un mecanismo para mantener bajo control a una célula con gran potencial de provocar daño vascular y tisular en caso de sobreactivación (Segel et al. 2011). Esto implica que la producción de nuevos neutrófilos debe ser constante y, de hecho, dos tercios de la producción de células sanguíneas en la médula ósea están dedicados a mantener el reservorio de neutrófilos (Borregaard 2010). Cada día un ser humano pone en circulación  $10^{11}$  nuevos neutrófilos, que en el transcurso de unas pocas horas saldrán del torrente sanguíneo, dirigiéndose a los tejidos donde se cree que son eliminados por macrófagos residentes. A su vez, esto promovería la producción y liberación de nuevos neutrófilos en la médula (Summers et al. 2010). La naturaleza rítmica del número de neutrófilos en sangre, que detallaremos en profundidad más adelante, implica una regulación muy precisa de la producción (granulopoyesis) y la salida (movilización) de neutrófilos desde la médula ósea.

La médula ósea es el lugar donde residen las **células madre y progenitoras hematopoyéticas** (HSPCs por sus siglas en inglés), la fuente de todas las células de la sangre, que están físicamente retenidas y reguladas por elementos estromales que se conocen como **nicho hematopoyético** (Morrison & Scadden 2014). El proceso por el cual estas HSPCs

dan como progenie al resto de células de la sangre se llama globalmente **hematopoyesis** (del gr. αἷμα, -ατος, ‘sangre’ y ποίησις, ‘creación’), aunque para cada linaje utilizamos un término distinto. Así, la producción de neutrófilos, o **granulopoyesis**, en la médula ósea adulta comienza por activar la **mielopoyesis**, la ruta de formación de células mieloides (que incluyen a los neutrófilos, monocitos/macrófagos, basófilos, eosinófilos, células dendríticas, megacariocitos y eritrocitos). Este proceso se inicia en las **células madre hematopoyéticas** (HSC, *hematopoietic stem cells*) activadas con señales como el factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF) (Mossadegh-Keller et al. 2013). La HSC se diferenciará de forma asimétrica dando lugar a otra HSC (autorenovación) y a un progenitor hematopoiético multipotente (MPP) con alta capacidad de proliferación pero con baja capacidad de autorenovación. Las HSCs dan lugar a dos linajes distintos, el linaje mieloides a través de los progenitores mieloides comunes (CMP, de *common myeloid progenitor*) y al linaje linfoides a través del progenitor linfoides común (CLP, de *common lymphoid progenitor*), que dará lugar a las células NK y a los linfocitos T y B. En el caso de la granulopoyesis, la HSC da lugar al CMP. Éste a su vez se diferencia y compromete hacia el estadio de **progenitor granulocítico y monocítico** (GMP).

A partir de ahí, el balance entre los factores de transcripción PU.1 y C/EBPα definirá si el progenitor continúa su diferenciación hacia monocito o granulocito (Cai et al. 2008), siendo también necesaria la participación de un factor de transcripción adicional, Gf1 (*growth factor-independent 1*) (Horman et al. 2009) y de C/EBPε (Lavin et al. 2014) para la diferenciación final hacia neutrófilo. Desde el estadio GMP, el **factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF)** es el principal factor que promueve granulopoyesis, y su receptor es inducido por C/EBPα (Zhang et al. 1997). Esto explica que la presencia de C/EBPα sea determinante para la diferenciación hacia neutrófilos de los GMPs, y que los ratones deficientes en este factor de transcripción no generen neutrófilos (Ma et al. 2014). La cascada continúa con los **mieloblastos**, **promielocitos** y **mielocitos**, sin capacidad de autorrenovación pero con capacidad de proliferación que en conjunto constituyen el reservorio mitótico de neutrófilos en la médula ósea. En estos estados comienzan a producirse los característicos gránulos que constituyen el repertorio defensivo de los neutrófilos y de los que hablaremos más adelante (Borregaard et al. 2007). A partir de los mielocitos, la diferenciación continúa con **metamielocitos**, **células bandeadas** y finalmente los **neutrófilos maduros**. Estos últimos tres constituyen el reservorio post-mitótico y son células diferenciadas sin potencial proliferativo (Bainton et al. 1971). La adquisición del núcleo multilobulado ocurre a medida que el neutrófilo madura (Teich et al. 1979). Véase un resumen de todo el proceso en la **Figura 2**.

Todo el proceso de granulopoyesis tiene lugar en los cordones hematopoiéticos de la médula ósea, que están rodeados de sinusoides medulares (Borregaard 2010). El tiempo de tránsito del reservorio post-mitótico en la médula ósea es de 4 a 6 días (Summers et al. 2010), tras el cual los neutrófilos son liberados a la sangre. La reserva medular de neutrófilos consta de unas  $6 \times 10^{11}$  células que, una vez maduras, residen cerca de los sinusoides (Scheiermann et al. 2015), listas para ser movilizadas al torrente sanguíneo.



**Figura 2: Proceso de granulopoyesis** a partir de las células madre hematopoyéticas (HSC), que se activan gracias a M-CSF para producir progenitores granulocíticos y monocíticos (GMP), que continuarán diferenciándose hacia neutrófilos en función de las señales y los factores de transcripción que predominen. Ilustración modificada de (Nicolás-Ávila et al. 2017).

### 2.2.3. MOVILIZACIÓN DE NEUTRÓFILOS DESDE LA MÉDULA ÓSEA

Los neutrófilos en la médula ósea se mantienen retenidos o se liberan al torrente sanguíneo en función de las necesidades del organismo, por ejemplo en situaciones de trauma o infección. El **factor estimulador de colonias de granulocitos o G-CSF** es una de las citoquinas más importantes para los neutrófilos pues, como hemos visto, interviene en su diferenciación desde progenitores mieloides, pero también porque promueve la movilización hacia el torrente sanguíneo (Semerad et al. 2002). Por este motivo, G-CSF se utiliza en clínica (Price et al. 1996) para tratar la neutropenia (Bhana 2007), es decir, un número anormalmente bajo de neutrófilos en circulación. La fagocitosis de neutrófilos senescentes en la médula ósea por parte de los macrófagos residentes promueve que éstos produzcan G-CSF,

lo que enlaza la eliminación de neutrófilos con su liberación en condiciones homeostáticas (Furze & Rankin 2008). Una observación intrigante fue que la movilización que produce G-CSF no requiere de su receptor GCSFR en neutrófilos. Estudios del laboratorio de Daniel Link demostraron que actúa, de manera indirecta, atenuando el eje CXCR4–CXCL12 (Semerad et al. 2002) al reducir la expresión de CXCL12 en componentes estromales de la médula. Al mismo tiempo favorece el eje CXCR2–CXCL1/2; estudios en modelos de ratón demostraron que G-CSF promueve la expresión de CXCL2 en las células endoteliales de los sinusoides medulares (Eash et al. 2010) y la producción de trombopoyetina, que estimula la producción de CXCL1 por los megacariocitos (Köhler et al. 2011). Puesto que CXCR4 actúa para retener y CXCR2 para movilizar, el efecto neto de G-CSF es una salida masiva de neutrófilos al torrente sanguíneo.

La actividad coordinada y antagonista de los receptores de quimioquinas CXCR4, que promueve retención, y CXCR2, que promueve movilización, es muy importante en el control homeostático del número de neutrófilos en circulación. Uno de los dos ejes principales es el **eje CXCR4–CXCL12**. Algunas células estromales de la médula ósea, principalmente los osteoblastos, células endoteliales y células reticulares abundantes en CXCL12 o células CAR (del inglés *CXCL12 abundant reticular*) producen constitutivamente CXCL12, el principal ligando de CXCR4 (Omatsu et al. 2010). En condiciones normales, los niveles de CXCL12 en médula muestran un patrón circadiano, aumentando y disminuyendo en función de los ciclos de luz y oscuridad. Este patrón diurno está gobernado por la inervación adrenérgica que, vía receptores adrenérgicos  $\beta_3$  sobre las células del nicho hematopoiético, promueve la degradación del factor de transcripción SP1 (que tiene sitios de unión en el promotor del gen de CXCL12). Esta señalización resulta en una disminución de la expresión de CXCL12 (Méndez-Ferrer et al. 2008). Estas oscilaciones de CXCL12 en médula van en antifase con el número de neutrófilos en circulación, como discutiremos con detalle más adelante (Casanova-Acebes et al. 2013), lo que sugiere que CXCL12 promueve retención de neutrófilos en la médula ósea.

Una evidencia adicional en favor de esta idea es que el bloqueo farmacológico de CXCR4 utilizando el antagonista AMD3100 (o plerixafor, como se conoce en el uso clínico) promueve la movilización de neutrófilos desde la médula ósea hacia la circulación (Devi et al. 2013; Broxmeyer et al. 2005). Animales deficientes en CXCR4 en células hematopoyéticas inducida en adultos (la eliminación total de CXCR4 es letal en estadios embrionarios) muestran neutrofilia, es decir, un número de neutrófilos anormalmente alto en circulación (Eash et al. 2009).

Inversamente, en animales que tienen una variante hiperseñalizadora del receptor de CXCR4 que aparece en pacientes con el síndrome WHIM (de *Warts, Hypogammaglobulinemia, Immunodeficiency, and Myelokathexis syndrome*) desarrollan neutropenia en circulación, la cual caracteriza también a los pacientes con dicho síndrome (Balabanian et al. 2012). En los neutrófilos, por tanto, CXCL12 sirve como una señal retentiva, y se ha descrito que mejora la unión de VLA-4 en leucocitos a VCAM1 (Petty et al. 2009) en las células endoteliales y estromales de la médula ósea (Scheiermann et al. 2015). Adicionalmente, los niveles tanto de CXCR4 como de VLA-4 bajan durante la maduración de los neutrófilos,



lo que facilita su movilización (Summers et al. 2010). Por otro lado, la fagocitosis de neutrófilos envejecidos o senescentes por parte de macrófagos residentes en la médula también promueve la bajada de los niveles de CXCL12 en médula, facilitando la salida de nuevos neutrófilos hacia el torrente sanguíneo (Furze & Rankin 2008).

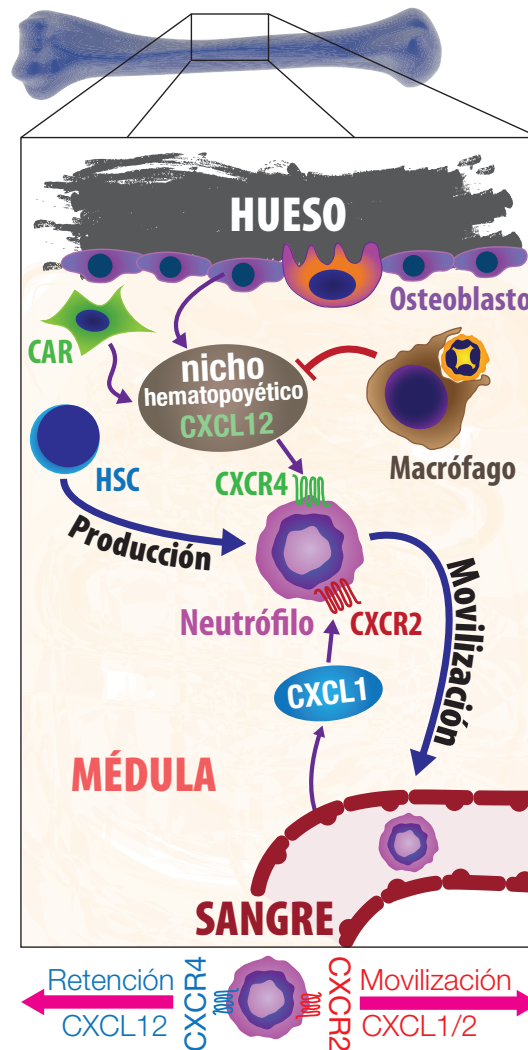
Por todo ello, una parte importante de la regulación de la movilización de neutrófilos desde la médula ósea consiste en el control de los niveles de CXCL12 en médula, en tanto promueven la retención en este órgano.

La otra parte importante en el control homeostático del número de neutrófilos en circulación es el **eje CXCR2–CXCL1/2**. Si bien el papel clásico de la señalización por CXCR2 es el reclutamiento de los neutrófilos a los focos inflamatorios (Stadtman & Zarbock 2012), estudios en animales deficientes en CXCR2 demuestran retención de neutrófilos en la médula ósea (Shuster et al. 1995). Análisis de animales quiméricos por trasplante simultáneo de médula ósea de animales tipo silvestre (WT por sus siglas en inglés) y deficientes en CXCR2 han demostrado que CXCR2 es importante para que los neutrófilos salgan de la médula ósea cuando se reducen los niveles de CXCL12, pues las células CXCR2<sup>-/-</sup> se quedan anormalmente retenidas en la médula. Estos datos son consistentes con la presencia de ligandos de CXCR2 como CXCL1 y CXCL2 en la médula ósea, producidos por las células endoteliales y osteoblastos (Eash et al. 2010).

Una observación importante realizada por el grupo de Sara Rankin fue que la estimulación a través de CXCR4 es capaz de atenuar significativamente la señalización a través de CXCR2, como se demostró en ensayos de migración exponiendo a los neutrófilos a CXCL12, CXCL1 o ambas (Martin et al. 2003). Esto indicó que unos niveles altos de CXCL12 tienen el doble papel de promover la retención e inhibir la señalización por CXCR2, que promueve la movilización. Por tanto, la señalización a través de CXCR2 compite con la señalización a través de CXCR4 para controlar la salida de los neutrófilos de la médula ósea, y de esta forma se establece un control preciso de la tasa de salida de neutrófilos a la circulación por medio de la señalización antagonística de estos dos receptores de quimioquinas. Véase para un resumen de este proceso la **Figura 3**.

Cuando el balance entre CXCL12 y CXCL1/2 es favorable a los últimos, los neutrófilos abandonan la médula ósea y salen al torrente sanguíneo vía migración transcelular (Burdon et al. 2008). A partir de este momento su vida es corta en circulación, en el rango de horas (S von Vietinghoff & Ley 2008). El grueso de este trabajo versará sobre los **cambios fenotípicos** que los neutrófilos sufren en ese lapso de tiempo, lo que llamaremos **proceso de envejecimiento** (*aging*) de los neutrófilos, y sobre sus consecuencias en homeostasis e inflamación.

Uno de los pasos críticos para que los neutrófilos puedan ejercer una respuesta inmune eficiente es el proceso de reclutamiento desde la circulación hacia las zonas inflamadas, por eso vamos a analizar primero lo que se conoce como cascada de reclutamiento del neutrófilo y veremos en el siguiente apartado el proceso de envejecimiento de los neutrófilos.



**Figura 3: Movilización de los neutrófilos al torrente sanguíneo.** Los neutrófilos reciben señales a través de CXCR4 que promueven su retención en la médula. Dichas señales provienen de las células que conforman el nicho hematopoyético. Estas señales inhiben las señales que reciben por medio de CXCR2, que promueven su liberación al torrente sanguíneo. El equilibrio entre unas y otras señales determina si el neutrófilo se queda en la médula ósea formando parte del reservorio medular o si se extravasa para pasar al compartimento sanguíneo. Ilustración modificada de (Adrover et al. 2016).

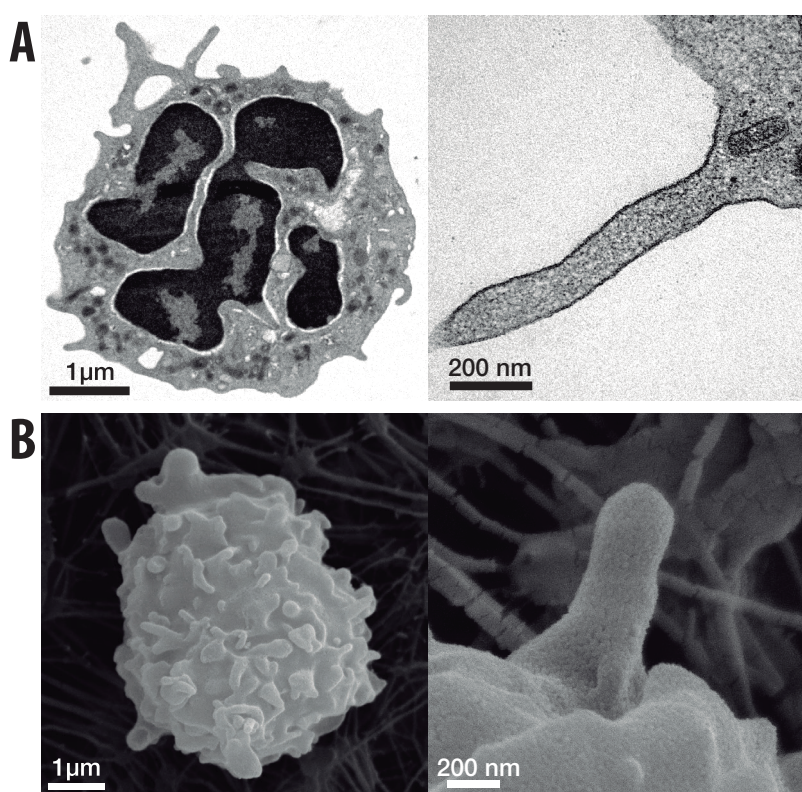
#### 2.2.4. CASCADA DE RECLUTAMIENTO DE LOS NEUTRÓFILOS

El primer paso de la respuesta inflamatoria de los neutrófilos consiste en detectar y llegar a las zonas en las que se está produciendo el daño. La **cascada de adhesión de los neutrófilos** se ha dividido en varios pasos en función del momento, cinética y moléculas que los caracterizan (Ley et al. 2007): rodamiento (*rolling*) rápido sobre la superficie endotelial, detección de señales proinflamatorias y activación de integrinas, rodamiento lento, adhesión firme y expansión o aplastamiento celular (*spreading*), polarización y arrastramiento (*crawling*) intraluminal y por último trans migración al espacio extravascular, también llamado extravasación o diapédesis. Éste último ocurre generalmente por vía paracelular,

aunque en algunos casos, como en la extravasación desde la médula, puede ser transcelular (Weiss 1970).

La mayor parte del reclutamiento de neutrófilos se da en las vénulas post-capilares (Sadik et al. 2011). Cuando las células centinela residentes en un tejido (macrófagos, mastocitos y células dendríticas) detectan daño, generalmente detectando PAMPs o DAMPs (Medzhitov 2008), se activan y liberan **mediadores proinflamatorios** que incluyen IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , quimioquinas y mediadores lipídicos (como leucotrienos) que activan a las células endoteliales para aumentar la exposición en superficie de moléculas de adhesión (Nourshargh & Alon 2014). Éstas incluyen principalmente P-selectina (CD62P), que se almacena en gránulos intracelulares en las células endoteliales, lo que facilita su rápida exposición en superficie, E-selectina (CD62E), y diversos ligandos de integrinas y quimioquinas que deben sintetizarse *de novo* (Pober & Tellides 2012).

En toda la cascada de adhesión hay un factor muy importante y que a menudo pasa desapercibido: la **topografía microanatómica de los receptores y ligandos** en el neutrófilo (y otros leucocitos). Como habíamos indicado anteriormente, los neutrófilos tienen una serie de microvellosidades que hacen irregular la superficie expuesta de la membrana plasmática, véase la **Figura 4**.



**Figura 4: Microvellosidades en la membrana plasmática de los neutrófilos.** **A)** Imagen de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de un corte de un neutrófilo completo (izquierda) y de una microvellosidad (derecha). **B)** Imagen de microscopía electrónica de escaneo (SEM) de un neutrófilo completo donde se pueden apreciar las microvellosidades en su superficie (izquierda) y el detalle de una de esas microvellosidades (derecha). Microfotografías capturadas en el Centro Nacional de Microscopía Electrónica (CNME) de la Universidad Complutense de Madrid (UCM).

La microanatomía de los receptores y ligandos implicados en todo el proceso de reclutamiento es importante pues una incorrecta topografía dificulta el proceso de adhesión de las células inmunes en flujo (Andrian et al. 1995). Esto se debe a que el glicocáliz, una capa de glicoproteínas y proteoglicanos de hasta un micrómetro de espesor que recubre a las células endoteliales, restringe la probabilidad de contacto entre las moléculas de adhesión (Schmidt et al. 2011).

Se ha hipotetizado que la naturaleza aniónica del glicocáliz (Pelikan et al. 1979) impide el acercamiento íntimo de los neutrófilos, también aniónicos (Lichtman & Weed 1970), por repulsión electrostática. En condiciones de bajo flujo, como el que se da en las vénulas postcapilares, las microvellosidades podrían penetrar el glicocáliz por su menor superficie y así iniciar los contactos requeridos para la captura del neutrófilo sobre el endotelio vascular (Weinbaum et al. 2007).

Los diferentes receptores y ligandos se posicionan diferencialmente sobre la superficie de la célula. Por ejemplo PSGL-1 (Moore et al. 1995) y la L-selectina (Bruehl et al. 1996) se localizan en los extremos de las microvellosidades, donde están más expuestos a moléculas endoteliales para permitir la captura inicial del neutrófilo; por el contrario, las integrinas como Mac-1 (CD11b/CD18 o  $\alpha M\beta 2$ ) se localizan principalmente en el cuerpo celular (Erlandsen et al. 1993), y requieren un contacto más íntimo con el endotelio para su unión con ICAM-1 (Diamond et al. 1990). Las microvellosidades dependen íntimamente del citoesqueleto de actina cortical (Andrian et al. 1995; Finger et al. 1996) y, por tanto, éste juega un papel clave en el proceso.

Teniendo esto en cuenta, a continuación se detallan los pasos principales de la cascada de adhesión del neutrófilo sobre la superficie luminal del endotelio vascular.

**Captura inicial y rodamiento sobre la superficie vascular.** Los neutrófilos circulantes tienen ligandos para ambas selectinas (P- y E-selectinas), principalmente PSGL-1, ESL-1 y CD44 (Hidalgo et al. 2007), y el primer paso de la cascada de reclutamiento es la unión de esos ligandos con las selectinas endoteliales. La disposición de PSGL-1 en el extremo, ESL-1 en el aspecto lateral de las microvellosidades, y CD44 en el cuerpo celular constituye un paradigma de la importancia de la distribución topológica en la función de los receptores (Hidalgo et al. 2007). Las uniones mediadas por selectinas son temporales y reversibles (Mócsai et al. 2015), lo que permite que el neutrófilo se frene en la llamada captura inicial (*tethering*), y rueda (*rolling*) a lo largo de la superficie endotelial, gracias a la formación y ruptura de uniones con las selectinas endoteliales. Las microvellosidades del neutrófilo juegan un papel decisivo en el proceso a modo un anclaje extensible que ayuda a la frenada, pudiendo extenderse varias micras en unas estructuras llamadas *slings*, mientras el neutrófilo disminuye su velocidad relativa al flujo (Sundd et al. 2012). Los neutrófilos también pueden ser capturados por otros leucocitos, incluidos otros neutrófilos, mediante la unión de PSGL-1 con la L-selectina presente en las células adheridas. Alternativamente, pueden ser frenados por la P-selectina presente en plaquetas o sus fragmentos depositados en la superficie endotelial (Nourshargh & Alon 2014). En este proceso de rodamiento (*rolling*) el neutrófilo disminuye su velocidad respecto a la del flujo vascular, y se permite su aproximación a la pared endotelial del vaso.

**Detección de señales proinflamatorias y activación de integrinas.** El acercamiento del neutrófilo a la pared vascular y su reducción de velocidad mediados por selectinas posibilitan que el neutrófilo interaccione con moléculas proinflamatorias en la superficie



luminal del vaso como CXCL1 o el factor de activación plaquetario (McEver 2015), lo que conlleva en última instancia la activación de integrinas  $\beta 2$  (Lorant 1991). Por otro lado, la unión de PSGL-1 con la E-selectina puede señalizar también de forma directa la activación de integrinas induciendo la activación de Syk que a su vez promueve la activación de integrinas (Herter & Zarbock 2013).

**Rodamiento lento.** El rodamiento de los neutrófilos sobre P-selectina es rápido, mientras que el rodamiento sobre E-selectina es más lento porque se expresa a mayores densidades y las afinidades de unión son más altas (Kunkel & Ley 1996). Este rodamiento más lento facilita aún más la interacción entre quimioquinas como CXCL1 depositadas sobre la superficie vascular y sus ligandos en el neutrófilo. La activación de receptores de quimioquinas activará aún más a las integrinas  $\beta 2$ , que pueden encontrarse en tres conformaciones con distintas afinidades por sus ligandos, como se indica en el apartado siguiente. La activación de integrinas ya sea directamente por la unión de las selectinas o por el reconocimiento de señales proinflamatorias por parte de receptores de quimioquinas ayuda a disminuir aún más la velocidad de los neutrófilos, que entran en un proceso de rodamiento lento. Las integrinas que se van activando ayudan a reducir la velocidad de los neutrófilos un 50%, de 10 a 5  $\mu\text{m/s}$  (McEver 2015). Esta reducción de velocidad se debe a que ahora no solamente se unen y rompen los enlaces entre las selectinas y sus ligandos, sino que se incorporan las integrinas  $\beta 2$ , que comienzan a unir y romper enlaces con sus ligandos (como ICAM-1) (Yago et al. 2010).

**Adhesión firme y aplastamiento celular.** Las integrinas existen en tres conformaciones de afinidades diferentes: “doblada y cerrada”, “extendida y cerrada” y “extendida y abierta” (Springer & Dustin 2012). En estado basal, las integrinas se encuentran en una conformación doblada y cerrada, pero la señalización a través de selectinas cuando el neutrófilo rueda sobre la superficie vascular promueve un cambio conformacional hacia la forma extendida y cerrada, que adquiere así una afinidad media por ICAM-1, que permite el rodamiento lento (Kuwano et al. 2010). Por contra, la señalización por ligandos de quimioquinas promueve la conformación extendida y abierta, de alta afinidad, que permite una interacción fuerte con ICAM-1 y consecuentemente el arresto o detención definitiva del neutrófilo en el endotelio (Abram & Lowell 2009). La señalización de fuera hacia dentro promueve que el neutrófilo se expanda (*spreading*) y aumente la superficie de contacto con el endotelio, contribuyendo a resistir la velocidad del flujo en circulación y al arresto definitivo (Mocsai 2015). El siguiente paso en la cascada de reclutamiento es la polarización del neutrófilo.

**Polarización y arrastramiento intraluminal.** Una vez que el neutrófilo está anclado en la superficie vascular, el siguiente paso es encontrar la forma de salir del vaso y seguir los gradientes de quimioquinas para llegar a la zona inflamada. Para ello el neutrófilo requiere cambios en su citoesqueleto que permiten una organización espaciotemporal distinta a la que tiene en circulación. De este modo, la célula se aplan y polariza adquiriendo un frente de migración con un lamelipodio protruyente en el que se dan rápidos procesos de polimerización de actina, y una parte trasera donde se concentran complejos de actomiosina contráctil que forman una estructura redondeada, el urópodo (Wong et al. 2006). Este es un proceso que sucede en cuanto el neutrófilo se adhiere firmemente al endotelio (Borregaard 2010). En este proceso de polarización son críticas las quinasas PI3K, las GTPasas como RhoA, Rac y CDC42, el citoesqueleto de actina (Nourshargh & Alon 2014), así como la existencia de gradientes de quimioatrayentes (Voisin & Nourshargh 2013), aunque este último



punto está aún en cuestión (Williams et al. 2011). El proceso permite, en última instancia, la redistribución de muchas proteínas entre los dos polos. Así Rac, CDC42 y PI3P se localizan en el frente de migración, mientras que RhoA y PTEN, entre otras, se localizan en el urópodo (Williams et al. 2011). La polarización coincide con el comienzo de los movimientos de arrastramiento (*crawling*) intraluminal, que permite a los neutrófilos encontrar el mejor lugar para extravasarse, generalmente entre las uniones endoteliales. El *crawling* es un proceso dependiente de integrinas  $\beta 2$  (Phillipson et al. 2006) en el que el movimiento intraluminal está mediado por Mac-1 y sus ligandos. Se ha descrito que en las uniones célula-célula del endotelio se acumulan ICAM-1 e ICAM-2, lo que permite que el neutrófilo se dirija a la zona por la que se va a extravasar (Alcaide et al. 2009). Para una imagen de microscopía intravital de este proceso, véase la **Figura 5**.

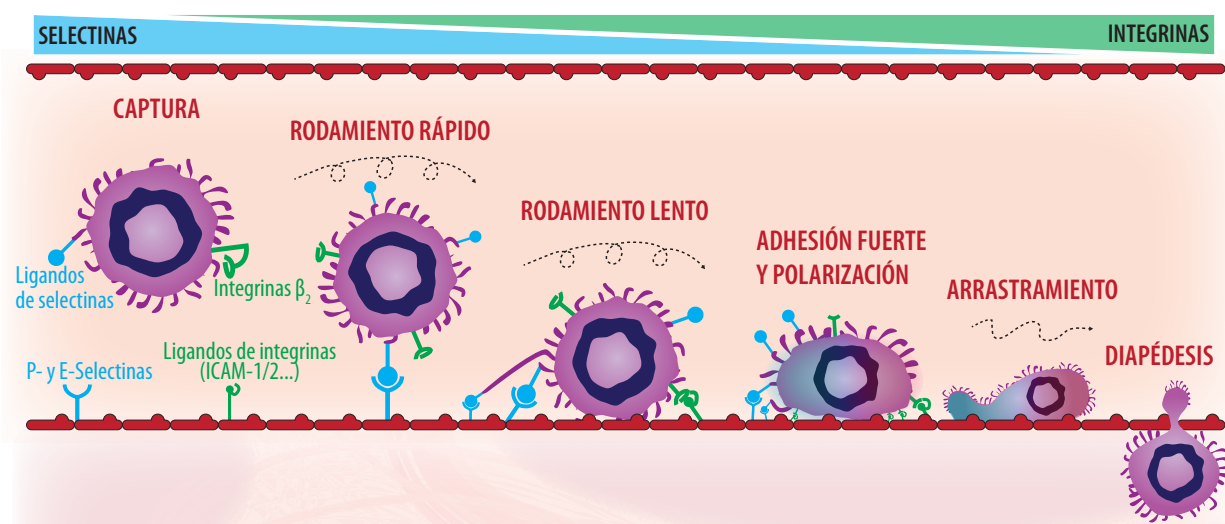


**Figura 5: Rodamiento y polarización en microscopía intravital.** La microscopía intravital nos permite observar el comportamiento de las células en el organismo vivo y es la técnica que ha permitido investigar a fondo la cascada de reclutamiento de los leucocitos. En la imagen, superposición de fotogramas de microscopía intravital de la microvasculatura de un músculo cremaster donde se observa de derecha a izquierda, siguiendo el flujo, a un neutrófilo (en gris, campo claro y en rojo, expresión de L-selectina) no polarizado y redondeado que está rodando sobre el endotelio vascular y que finalmente se detiene y polariza, como pone de manifiesto la expresión diferencial de L-selectina, ausente en el polo frontal.

**Extravasación.** Tras el movimiento del neutrófilo buscando generalmente las uniones intercelulares del endotelio vascular, el siguiente paso es la salida del neutrófilo fuera de la circulación (extravasación o diapédesis). Para ello utilizan una serie de moléculas de adhesión presentes en las uniones entre células endoteliales como PECAM-1, JAM-A, -B y -C, ICAM-2, CD99 o ESAM (Voisin & Nourshargh 2013) que mantienen la integridad de las uniones endoteliales, pero también facilitan el paso de los leucocitos hacia el espacio extravascular. Gracias a Mac-1 e ICAM-1 el neutrófilo llega a la unión intercelular donde, mediante señales vía ICAM-1 sobre la célula endotelial, las quinasas Src y Pyk-2 fosforilan la VE-Cadherina de las uniones intercelulares y las desestabilizan (Allingham et al. 2007). La acción secuencial de las proteínas ICAM-2, JAM-A y PECAM-1, presentes en la unión intercelular, ayuda a que los neutrófilos penetren más a medida que se rompen las uniones de cadherinas (Woodfin et al. 2009). Una vez atravesada la capa endotelial, los neutrófilos utilizan distintas proteasas como MMP8 y MMP9 para moverse por la membrana basal, y navegan gracias a la guía de PECAM-1 hasta encontrar zonas de menor espesor, que coinciden con las zonas de separación entre los pericitos (Voisin & Nourshargh 2013). Al final del proceso de extravasación, los neutrófilos sufren una elongación del urópodo que

a menudo produce su rotura generando una micropartícula rica en integrinas que podría tener funciones de señalización (Hyun et al. 2012).

Una vez en el tejido, los neutrófilos siguen gradientes de quimioquinas, citoquinas, PAMPs o DAMPs que les llevan directamente a la zona dañada, donde pueden ejercer su función inflamatoria. Para un resumen de la cascada de reclutamiento de los neutrófilos, véase la **Figura 6**.



**Figura 6: Cascada de reclutamiento de los neutrófilos.** El reclutamiento comienza con la captura inicial del neutrófilo sobre la pared del endotelio, mediada por selectinas endoteliales y ligandos de selectinas en las microvellosidades del neutrófilo circulante. La creación y rotura de enlaces entre las selectinas provoca el rodamiento rápido del neutrófilo sobre la pared vascular, mientras la señalización de las selectinas provoca la activación de integrinas a un estado de afinidad media, que ayuda a disminuir la velocidad del neutrófilo (rodamiento lento) y a acercarlo a la pared endotelial, donde entra en contacto con quimioquinas y otras moléculas proinflamatorias. A su vez éstas activan totalmente a las integrinas provocando una unión más fuerte con sus ligandos (como ICAM-1 o -2) y la detención o adhesión fuerte del neutrófilo sobre el endotelio. Finalmente se produce su polarización y comienza la fase de arrastramiento (*crawling*) hacia las uniones intercelulares del endotelio, donde podrá extravasarse.

## 2.2.5. PROCESO DE ENVEJECIMIENTO DE LOS NEUTRÓFILOS

Como habíamos apuntado anteriormente, los neutrófilos tienen una vida corta en circulación, del orden de horas (Summers et al. 2010). Tras este periodo, los neutrófilos son eliminados de la circulación en la fase de *clearance*, a lo que sigue una nueva oleada de salida desde la médula ósea (Adrover et al. 2016). Esta dinámica de salida y *clearance* tiene una ritmicidad circadiana, es decir, un periodo de aproximadamente 24 horas. Esto exige un fino control homeostático de los niveles de neutrófilos en distintos puntos: la producción y su almacenamiento temporal en la médula ósea, su marginación intravascular definida como grupos discretos de neutrófilos que permanecen dentro de los vasos pero que no están en circulación (por ejemplo por retención pasiva en diferentes órganos

como el pulmón (Devi et al. 2013)), su salida de la circulación (*clearance*) y su eliminación (Bratton & Henson 2011).

Pese a no ser una nomenclatura totalmente asentada, nosotros denotaremos a lo largo de este trabajo a los neutrófilos recién salidos de la médula ósea hacia la sangre como **neutrófilos frescos**, y a los que han sufrido el proceso de envejecimiento en circulación como **neutrófilos envejecidos**. En la literatura también se encuentran otras terminologías como neutrófilo joven (por fresco) y senescente (por envejecido, pese a que no hay evidencias de que se trate de un proceso de senescencia celular *stricto sensu*). Para la fase de salida de los neutrófilos desde la circulación hacia los tejidos utilizaremos el término *clearance*.

Este proceso de producción y eliminación de cerca de  $10^{11}$  neutrófilos (Sadik et al. 2011) cada día da una idea de la importancia de mantener bajo control a estas células y su gran potencial citotóxico. Al mismo tiempo, supone un gran gasto energético que sugiere un papel relevante de los neutrófilos no solo en inflamación, sino también en la homeostasis del organismo (Adrover et al. 2016).

En otros tipos celulares se ha descrito que ciertos mecanismos intrínsecos pueden gobernar las dinámicas poblacionales, como por ejemplo en las plaquetas (Dowling et al. 2010) o los eritrocitos (de Back et al. 2014). En estos tipos celulares se cree que alteraciones en el balance o la estructura de una serie de proteínas con el tiempo favorecen su eliminación, normalmente por macrófagos residentes en el bazo o hígado. Por ejemplo, en las plaquetas (que viven 8-9 días) la cantidad de la proteína antiapoptótica Bcl-xL que han heredado de su progenitor (el megacariocito) define un reloj interno hasta su muerte. A medida que Bcl-xL se degrada, el balance entre ésta y la proteína proapoptótica Bak se va inclinando, hasta que finalmente Bak queda libre para iniciar la apoptosis (Mason et al. 2007). En los eritrocitos humanos, que viven aproximadamente 120 días en circulación, se acumulan gradualmente gran cantidad de modificaciones post-traduccionales del repertorio proteico, debidas a cambios metabólicos y al aumento del estrés oxidativo (Lutz & Bogdanova 2013). La vesiculación de la membrana responde a la exocitosis de proteínas no funcionales, aumenta la densidad intracelular del eritrocito y reduce la deformabilidad y flexibilidad de la membrana. Este proceso de vesiculación expone a su vez marcadores de senescencia (Antonelou et al. 2010) que serán reconocidos por los macrófagos residentes del bazo. En el caso de los neutrófilos, sin embargo, no está claro qué mecanismos gobiernan sus dinámicas fisiológicas y su eliminación diaria. No obstante, una serie de alteraciones celulares que ocurren a lo largo del tiempo, a lo que nos referimos como **proceso de envejecimiento de los neutrófilos**, correlacionan estrechamente con sus dinámicas. Éste proceso podría estar causado por el ambiente en que las células se encuentran, por procesos internos en el propio neutrófilo o por una combinación de los dos.

La mayoría de los estudios que han analizado el envejecimiento de los neutrófilos se han hecho *in vitro*. Cuando los neutrófilos se cultivan *ex vivo* (fuera del organismo), se observan **cambios fenotípicos** que incluyen un aumento de la expresión en superficie del receptor de quimioquinas CXCR4 (Martin et al. 2003), que es aparente a las 4 horas del cultivo (Nagase et al. 2002). Este aumento de CXCR4 en superficie facilita que los neutrófilos envejecidos retornen a la médula ósea (Martin et al. 2003), donde los niveles de CXCL12 son muy altos (Mercier et al. 2012). Esto parecería indicar que la regulación al alza de CXCR4 en el proceso de envejecimiento de los neutrófilos permitiría su eliminación posterior de la circulación o *clearance*. Estudios recientes apuntan, sin embargo, a

que CXCR4 es al menos parcialmente prescindible para este proceso, pues los neutrófilos marcados metabólicamente con BrdU de animales WT o deficientes en CXCR4 muestran similares cinéticas de desaparición de sangre. Además, en experimentos de transferencia adoptiva de neutrófilos CXCR4-deficientes a animales WT se ha observado una importante reducción, pero no una completa ausencia, de migración de éstos a la médula (Eash et al. 2009).

Otros estudios han observado una disminución de los niveles de CXCR2 en los neutrófilos en cultivo (Eash et al. 2010). CXCR2 es el principal receptor de quimioquinas en los neutrófilos, lo que parecería indicar que el proceso de envejecimiento reduce su capacidad de respuesta inflamatoria. Estudios recientemente han descrito, sin embargo, que los neutrófilos envejecidos son más reactivos que sus versiones frescas (Zhang et al. 2015; Uhl et al. 2016). En última instancia, sigue sin estar claro en la literatura el papel inflamatorio de los neutrófilos frescos y envejecidos. Esto puede tener importancia clínica dado el primordial papel de los neutrófilos en la respuesta inmune, y su implicación en enfermedad inflamatoria como el daño por isquemia/reperfusión tras un infarto de miocardio, la sepsis o el daño pulmonar agudo (Sreeramkumar et al. 2014; Kolaczowska & Kubes 2013; Phillipson & Kubes 2011).

Estos cambios en los niveles de receptores de quimioquinas preceden, en los neutrófilos cultivados *in vitro*, a una fase de **apoptosis** (muerte celular programada) que tiene lugar a las 20 horas de iniciarse el cultivo (Whyte et al. 1993). Se cree que los neutrófilos apoptóticos son capaces de conservar su integridad celular más tiempo que otros tipos celulares, quizá por el uso de la glucólisis como fuente de energía (Bratton & Henson 2011); esto, a su vez, podría dar más tiempo a los macrófagos para fagocitarlos *in vivo*, como una forma de evitar la liberación necrótica de su carga citotóxica. De nuevo, el mecanismo de muerte de los neutrófilos en estado basal (no inflamatorio) es desconocido, aunque se ha apuntado a un proceso dependiente del balance de proteínas proapoptóticas de larga vida media que son contrarrestadas por la proteína antiapoptótica Mcl1, cuyo mRNA tiene una vida muy corta. En este escenario, la síntesis constante *de novo* de Mcl1 sería esencial para la supervivencia de los neutrófilos y del balance dependería la apoptosis en estas células (Akgul et al. 2001). Otra alternativa es la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en los neutrófilos envejecidos *ex vivo*, que inhibiría el eje PI3K-Akt promoviendo la apoptosis (Caielli et al. 2012). En este sentido, los neutrófilos envejecidos en cultivo presentan niveles mucho menores del antioxidante NADPH comparados con los neutrófilos frescos (Graham et al. 2009). En cualquier caso, la relación entre envejecimiento de los neutrófilos y su apoptosis *in vivo* no está aún definida, pues no se ha podido detectar unión de Anexina-V o caspasas 3 activas en los neutrófilos, al menos en circulación (Casanova-Acebes et al. 2013).

Si los estudios *in vitro* del proceso de envejecimiento de los neutrófilos son escasos, los estudios *in vivo* lo son más aún. Se ha demostrado por marcajes metabólicos con BrdU que los neutrófilos también disminuyen su expresión de L-selectina en superficie durante el envejecimiento *in vivo* (van Eeden et al. 1997). En nuestro laboratorio se analizaron recientemente los neutrófilos a lo largo del ciclo circadiano en un escenario más fisiológico, y se identificó la población de neutrófilos envejecidos usando como marcadores la expresión de CD62L (L-selectina) y de CXCR4 (Casanova-Acebes et al. 2013). Así se identificó una población de neutrófilos envejecidos en circulación que presentaba altos niveles de CXCR4, CD11b y CD49d y bajos niveles de CD62L, comparados con neutrófilos frescos. Estos datos fueron confirmados en publicaciones posteriores, en las que se añadieron



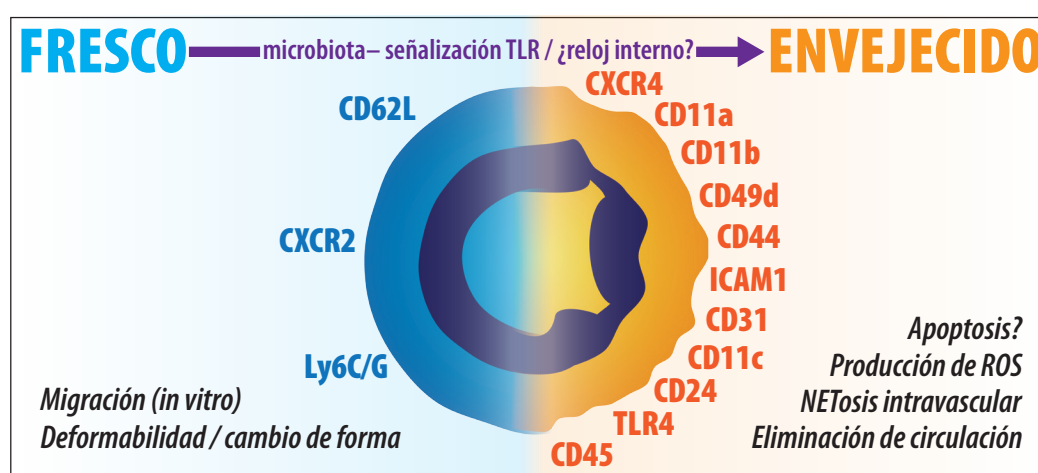
a la lista altos niveles de CD11c, CD24, CD45, ICAM1 (CD54), CD11a, CD31, CD44 y TLR4; y bajos de Gr-1 (Zhang et al. 2015; Uhl et al. 2016). Para un resumen de estos marcadores véase la **Figura 7**. Se ha descrito que los cambios en marcadores de superficie coinciden con cambios en la morfología nuclear, que se hace más multilobulada a medida que el neutrófilo envejece (Casanova-Acebes et al. 2013). El significado de estos cambios en morfología todavía se desconoce.

El **mecanismo** que controla este proceso de envejecimiento del neutrófilo permanece aún en gran parte desconocido. Solo recientemente se ha propuesto que podría estar controlado por señales de la microbiota (Zhang et al. 2015), pues al administrar a ratones un cocktail de antibióticos que altera la microbiota intestinal, los animales mostraron una reducción en el número de neutrófilos envejecidos en circulación. El mismo efecto aparece en animales deficientes en TLR4, TLR2 y Myd88, una molécula adaptadora en la señalización por TLRs. Pero la interpretación de este estudio se dificulta porque el tratamiento con antibióticos reduce los niveles de G-CSF y el número de neutrófilos en circulación (Liu et al. 2014), y porque el estudio carece de controles del efecto de los antibióticos *per se* en los neutrófilos, que pueden tener efecto a varios niveles como producción de ROS, degranulación o polimerización de actina, entre otros (Mackett & Guay 1985; Gunther et al. 1993; Brom et al. 1992; Akamatsu et al. 1990). Además, no se tuvieron en cuenta en cuanto a metodología las variaciones diurnas de los neutrófilos ni de la microbiota, por lo que consideramos que hacen falta más estudios para esclarecer la mecánica del proceso de envejecimiento de los neutrófilos.

El **impacto funcional de este proceso de envejecimiento sobre el neutrófilo**, está solo parcialmente determinado. Se ha demostrado *in vitro* que los neutrófilos con bajos niveles de CD62L (envejecidos) presentan menor polimerización de F-actina, menor deformabilidad y capacidad de cambiar de forma, menor trans migración y más producción de peróxido de hidrógeno que la población con niveles más altos de CD62L (Tanji-Matsuba et al. 1998). Esto podría indicar que los neutrófilos frescos tienen más capacidad de responder rápidamente a un insulto inflamatorio en los tejidos, aunque otras publicaciones recientes proponen que los neutrófilos envejecidos son los que median la respuesta inflamatoria, al menos en el espacio intravascular (Zhang et al. 2015). Esto ocurre tanto por activación de integrinas como por mayor susceptibilidad de liberar DNA recubierto de proteínas granulares. Estas NETs o trampas extracelulares del neutrófilo (del inglés *Neutrophil Extracellular Traps*) son una forma de muerte celular de los neutrófilos en la que éstos descondensan la cromatina y la expelen al medio extracelular formando una red de DNA e histonas revestida de moléculas citotóxicas procedentes de los gránulos del neutrófilo, como la mieloperoxidasa o la elastasa, que son tóxicas para los microorganismos patógenos (Brinkmann et al. 2004), pero pueden también dañar a los tejidos sanos (Knight et al. 2015). Otro estudio, sin embargo, sugiere un papel más activo de neutrófilos envejecidos en la respuesta extravascular (Uhl et al. 2016). Una consideración importante, no obstante, es que estos análisis se hicieron en animales tratados con antibióticos o con neutrófilos transferidos de un animal a otro. El posible efecto de los antibióticos utilizados y la activación de los neutrófilos al someterlos a manipulación para su transferencia son problemáticos. Estos trabajos previos, aunque informativos, dejan el papel de los neutrófilos frescos y envejecidos en la respuesta inmune, por tanto, por definir.



Las **consecuencias** del envejecimiento de los neutrófilos son también en gran medida desconocidas. Se ha especulado que este proceso facilite y favorezca el *clearance* de los neutrófilos fuera de la circulación y su migración a los tejidos (Casanova-Acebes et al. 2013). El hecho de que los neutrófilos se ajusten a ciclos día-noche (circadianos) es, además, interesante porque muchas reacciones inflamatorias de alta prevalencia que dañan órganos sanos y que están causadas por los neutrófilos tienen también un comportamiento circadiano en la clínica (Scheiermann et al. 2013), como por ejemplo el infarto de miocardio (Suarez-Barrientos et al. 2011), lo que podría indicar un papel diferencial de los neutrófilos frescos y envejecidos en estas enfermedades. Ninguna de estas posibilidades, sin embargo, ha sido directamente evaluada.



**Figura 7: Marcadores de superficie** regulados al alza en los neutrófilos frescos (izquierda) o envejecidos (derecha), y características generales de unos y otros en base a la literatura actual. Ilustración modificada de (Adrover et al. 2016).

## 2.2.6. ELIMINACIÓN DE LOS NEUTRÓFILOS DE CIRCULACIÓN

Todos los cambios que hemos mencionado se acumulan paulatinamente en los neutrófilos en circulación a medida que salen de la médula ósea, y preceden a una fase de **eliminación o clearance de los neutrófilos de la circulación**. Pese a que el proceso de envejecimiento se definió inicialmente por anteceder al proceso de *clearance*, no hay evidencias de que ambos procesos estén causalmente conectados. Este proceso de eliminación de neutrófilos de la circulación podría estar controlado de manera extrínseca al neutrófilo, por ejemplo por cambios en las moléculas de adhesión del endotelio, como ICAM-1, que oscila de manera circadiana en las vénulas postcapilares del músculo cremaster (Scheiermann et al. 2012). Pero, por otro lado, otros estudios sugieren un papel activo del neutrófilo. Por ejemplo, la regulación al alza de sus niveles de CXCR4 que es necesaria, al menos parcialmente, para su *clearance* hacia la médula ósea (Rebecca C Furze & Rankin 2008), que es uno de los principales órganos a los que los neutrófilos migran al desaparecer de circulación. Además, es intrigante que en otros tipos celulares se ha demostrado un control intrínseco celular de sus poblaciones, como los monocitos Ly6C<sup>HI</sup> (Nguyen et al. 2013) o el linaje T<sub>H</sub>17 (Yu et al. 2013). Pero en el caso de los neutrófilos este aspecto sigue sin estar explorado.

Los **neutrófilos eliminados de circulación migran hacia los tejidos**. En la literatura se ha analizado su migración a la médula ósea principalmente (Rankin 2010), aunque también al bazo y el hígado (Suratt et al. 2001; Ussov et al. 2009). Al volver a la médula ósea, los neutrófilos envejecidos sufren apoptosis y son fagocitados por los macrófagos residentes (Gordy et al. 2011), lo que algunos estudios sugieren que estimula la producción de G-CSF (R C Furze & Rankin 2008). Este mecanismo sugiere una retroalimentación que enlazaría la eliminación de neutrófilos con la producción y liberación de una nueva oleada de neutrófilos a la sangre. Adicionalmente, la eliminación de neutrófilos en otros tejidos es capaz de modular remotamente la producción en la médula. En este modelo de “*neutrostasis*” la fagocitosis de neutrófilos eliminados en el bazo o el pulmón por parte de los macrófagos residentes reprime la expresión de IL-23, una citoquina que regula la producción de IL-17 por células T y que induce producción de G-CSF (Stark et al. 2005). De este modo la eliminación en periferia disminuiría los niveles de G-CSF, resultando en una supresión de la granulopoyesis. En ambos casos, la regulación positiva o negativa de la médula ósea por parte de neutrófilos envejecidos depende de que los macrófagos sean capaces de fagocitar a los neutrófilos (Casanova-Acebes et al. 2013). En la médula ósea y otros tejidos la fagocitosis estimula los receptores LXR, que son receptores que responden a oxisteroles intracelulares (Noelia & Castrillo 2011), y son reguladores de la transcripción de IL-23, que inicia el proceso neutrostático, de modo que los animales deficientes en estos receptores LXR desarrollan neutrofilia (Hong et al. 2012).

Uno de los puntos críticos a tener en cuenta es que todos los procesos que hemos visto en relación a los neutrófilos se ajustan a una periodicidad de aproximadamente 24 horas, es decir, se trata de un proceso que tiene un comportamiento circadiano y que, por tanto, tiene potencial implicación en procesos de inmunidad en respuesta a cambios en el entorno (Man et al. 2016). Se desconoce, sin embargo, si los ciclos temporales de neutrofilos e inmunidad del organismo están causalmente relacionados.

### 2.2.7. LOS NEUTRÓFILOS EN DEFENSA E INFLAMACIÓN

Los neutrófilos son la primera línea de defensa del organismo frente a infecciones y representan el 50-70% de los leucocitos en sangre en humanos, y alrededor del 10% en ratón. Siguiendo gradientes quimiotácticos son capaces de llegar en gran número a los tejidos inflamados desde la circulación, y una vez allí fagocitar o destruir a los microorganismos invasores gracias al contenido citotóxico de sus gránulos. También promueven la atracción de otras células del sistema inmune, como células T y B (liberando IFN $\gamma$  o BAFF), monocitos y células dendríticas (liberando moléculas pro-inflamatorias como TNF $\alpha$ ) y ayudan a coordinar la respuesta inmune en la zona de daño (Nathan 2006).

El papel fundamental de la **capacidad de migración** de los neutrófilos en la respuesta inmune se pone de manifiesto en los síndromes humanos causados por deficiencias en la cascada de adhesión (LADs, de *leukocyte adhesion deficiencies*). Hay tres tipos principales de LAD, que afectan a distintos pasos de la cascada de reclutamiento, y cursan con infecciones. La LAD de tipo I se debe a mutaciones que afectan a las integrinas  $\beta 2$ , y causa infecciones bacterianas recurrentes ya que los neutrófilos no pueden adherirse al endotelio (Anderson & Springer 1987). La LAD de tipo II afecta al rodamiento de los

neutrófilos en la pared vascular, se debe a mutaciones en las fucosil-transferasas que impiden la glicosilación de los ligandos de selectina (Etzioni et al. 1999), y cursa con infecciones, sobre todo periodontales, que normalmente no amenazan la vida de los pacientes (Abram & Lowell 2009). Curiosamente, éstos presentan también retardos psicológicos y de crecimiento, posiblemente a causa de deficiencias en fucosilación de proteínas requeridas para el desarrollo (Etzioni et al. 1992). Por último, la LAD de tipo III se produce por defectos en la activación de integrinas por las quimioquinas. Esto impide la adhesión fuerte al endotelio y también provoca infecciones recurrentes (Alon et al. 2003). Estos y otros síndromes (Keszei & Westerberg 2014) relacionados con la capacidad de extravasación de los neutrófilos muestran que este tipo celular es clave en la defensa del organismo.

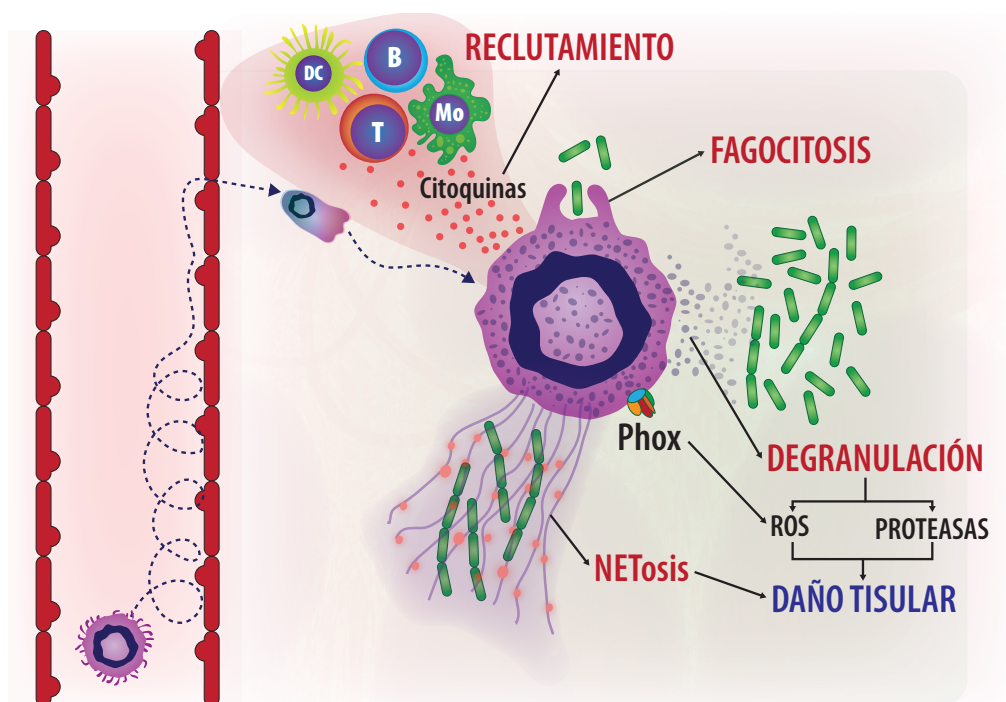
Una vez en contacto con los microorganismos patógenos, los neutrófilos pueden eliminarlos directamente por fagocitosis y posterior digestión intracelular, pueden degranularse liberando proteasas y especies reactivas de oxígeno que ataquen a los microorganismos, o pueden sufrir un tipo especial de muerte programada con función defensiva, la NETosis.

Los neutrófilos poseen tres tipos principales de **gránulos**: azurófilos o primarios, específicos o secundarios y los gránulos de gelatinasa o terciarios, de orígenes y naturaleza distintos. Los **gránulos azurófilos** contienen elastasa, catepsina G, proteinasa 3, defensinas, mieloperoxidasa, lisozima, sialidasa entre otras, y se sintetizan en el estadio de promielocito (Bainton & Farquhar 1968). Los **gránulos específicos** contienen colagenasas, cristalininas, lisozimas, lipocalina asociada a gelatinosa (NGAL), lactoferrinas, haptoglobinas, prodefensinas,  $\alpha$ -1-antitripsina (ADAMS17), heparanasa,  $\beta$ -2-microglobulina y CRISP3, entre otras, y se sintetizan en el estadio de mielocito. Por último, los **gránulos de gelatinasa** contienen gelatinasa, arginasa 1, lisozima,  $\beta$ -2-microglobulina y CRISP3, y se sintetizan en los estadios de metamielocito y célula bandeadas (Borregaard 2010; Bainton et al. 1971). Los neutrófilos poseen además un cuarto tipo de gránulos, las **vesículas secretoras**, que son endocíticas en naturaleza, pero que poseen una gran cantidad de proteínas ancladas en su membrana que pueden movilizarse rápidamente a la membrana plasmática del neutrófilo para amplificar su capacidad de respuesta (Borregaard et al. 1992). Entre estas moléculas rápidamente movilizables se encuentran integrinas (Mac-1), componentes de la NADPH-oxidasa que usan los neutrófilos para generar especies reactivas de oxígeno con capacidad microbicida (Jesaitis et al. 1990), metaloproteasas o receptores de interferon, de interleuquinas (IL-1, -4, -6, -10, -13, -17 y -18), de quimioquinas (CXCR1, CXCR2, CXCR4, CCR1, 2 y 3), de inmunoglobulinas y TLRs (Borregaard et al. 2007). Esto permite que la fusión de las vesículas secretoras, que se da como respuesta a incrementos leves del calcio intracelular, dote muy rápidamente a los neutrófilos de un nuevo arsenal de receptores que los haga más eficaces para responder a un estímulo inflamatorio. La función de reservorio intracelular de receptores también la hacen los gránulos secundarios y terciarios, que tienen componentes de la NADPH-oxidasa (Gp91phox/p22phox), receptores de TNF y moléculas de adhesión como Mac-1, CD66 o CD67 (Ducker & Skubitz 1992; Bainton et al. 1987).

Los neutrófilos poseen un sistema capaz de generar grandes cantidades de especies reactivas de oxígeno que utilizan, junto con las proteasas de los gránulos, para eliminar a los microorganismos, un mecanismo que se conoce como **estallido respiratorio** (del inglés, *respiratory burst*). Éste depende del complejo NADPH-oxidasa (también conocida como Phox), que consiste en una unidad catalítica, gp91phox y varias subunidades regulatorias cuyo ensamblaje controla la producción de aniones superóxido ( $O_2^-$ ), gracias a la donación

de electrones desde la coenzima NADPH (Lambeth 2004). La importancia de este proceso se evidencia en la enfermedad granulomatosa crónica (CGD, de *chronic granulomatous disease*). En ella, mutaciones de gp91phox impiden el estallido respiratorio y ocasionan infecciones recurrentes (Dinauer et al. 1989).

Los neutrófilos también pueden atacar a los microorganismos mediante un tipo especial de muerte celular programada, la NETosis (Remijsen et al. 2011). Ésta tiene como fin la formación de **trampas extracelulares** llamadas NETs (de *neutrophil extracellular traps*). Son estructuras compuestas de ADN nuclear asociado a histonas citrulinadas y a gran variedad de proteínas microbicidas granulares que confinan físicamente a modo de red y destruyen a los microorganismos (Brinkmann et al. 2004). Sin embargo, no están claros los factores que determinan que el neutrófilo opte por la degranulación clásica o la NETosis (Yipp & Kubes 2013). Para un resumen de los distintos mecanismos que los neutrófilos pueden usar contra los microorganismos invasores, véase la **Figura 8**.



**Figura 8: Los neutrófilos en defensa e inflamación.** Los neutrófilos pueden eliminar a los microorganismos invasores utilizando varias estrategias diferentes. Pueden fagocitarlos y digerirlos intracelularmente; degranular y eliminarlos con su arsenal citotóxico; o formar una NET que atrape y destruya a los microorganismos. También tienen un papel promoviendo el reclutamiento de células dendríticas (DC), monocitos (Mo) y linfocitos T y B, emitiendo citoquinas proinflamatorias.

El potencial citotóxico de los neutrófilos los hace muy efectivos a la hora de eliminar microorganismos invasores, pero también les dota de una gran capacidad de producir **daño a tejidos sanos** en caso de una activación patológica o incontrolada (Weiss 1989). Por ejemplo, estudios recientes han puesto de manifiesto su papel en aterosclerosis, dado que su número en la placa correlaciona con la tendencia de ésta a romperse (Ionita et al. 2010). Además, un aumento o disminución experimental del número de neutrófilos en circulación correlaciona con el tamaño de las placas ateroscleróticas (Drechsler et al. 2010; Zernecke et al. 2008).



Otros estudios muestran que las NETs podrían tener también un papel, pues al bloquear la NETosis con inhibidores de la enzima PAD4, esencial para la citrulinación de las histonas, se retrasa la aterogénesis y protege de trombosis arterial en modelos de ratón (Knight et al. 2014).

Los neutrófilos también se han implicado en la exacerbación del daño tras un infarto de miocardio agudo (AMI de *acute myocardial infarction*). Los neutrófilos son reclutados al punto de formación del trombo durante el AMI (Distelmaier et al. 2009), y durante las primeras 24 horas tras el infarto infiltran en grandes cantidades el miocardio infartado, independientemente de que se haya producido reperusión (Frangogiannis & Rosenzweig 2012). En pacientes humanos se detecta un aumento de marcadores de NETosis en plasma, y sus niveles correlacionan con el tamaño de infarto (Helseth et al. 2016). Además, los pacientes con números más elevados de neutrófilos en circulación tienen peor pronóstico tras un infarto (Kyne et al. 2000).

En el ictus también juegan un papel relevante (Kim et al. 2016), pues se acumulan en la zona infartada y esto correlaciona con el tamaño de infarto y el déficit cognitivo resultante (Akopov et al. 1996). Además, la reducción farmacológica de la adhesión y subsecuente infiltración al tejido isquémico de los neutrófilos tras un ictus es capaz de reducir el área cerebral infartada (DeGraba 1998). También se ha observado una disminución del tamaño de infarto con inhibidores farmacológicos del receptor CXCR2 (Villa et al. 2007).

Como último ejemplo, los neutrófilos también juegan un papel importante en la trombosis a través de la formación de NETs intravasculares (Pfeiler et al. 2016; Kimball et al. 2016). La interacción entre los neutrófilos y las plaquetas promueve la formación de NETs (Clark et al. 2007) y éstas, a su vez, favorecen la adhesión y activación de las plaquetas (Semeraro et al. 2011). La interacción entre los neutrófilos y las plaquetas activadas promueve la activación de la coagulación por la vía extrínseca (Massberg et al. 2010). Se especula que la trombosis podría ser una defensa natural para evitar la diseminación de microorganismos en circulación, que implicaría la generación de NETs para destruir a los microorganismos, y una trombosis fisiológica controlada para evitar su diseminación (Engelmann & Massberg 2013). En condiciones patológicas, este mecanismo tendría efectos deletéreos, empeorando los procesos trombo-inflamatorios, por ejemplo, tras un infarto de miocardio (Mangold et al. 2015). En algunos casos, las NETs descritas en trombosis no tenían la morfología clásica, sino una morfología fragmentada, pese a incluir DNA e histonas, y componentes derivados de neutrófilos, como la MPO (Massberg et al. 2010).

Los neutrófilos tienen, en resumen, un papel clave en la defensa del organismo y una serie de mecanismos muy eficaces para llevarla a cabo, pero ese mismo hecho posibilita un efecto deletéreo de los neutrófilos sobre los tejidos sanos si éstos se activan en el momento o lugar inadecuados. Pese a que la concepción clásica de los neutrófilos se ha limitado a su papel en la destrucción de microorganismos, recientemente se ha puesto de manifiesto que también tienen un papel en la patogénesis de gran cantidad de enfermedades crónicas, así como efectos tanto pro- como anti-tumorales (Nicolás-Ávila et al. 2017).



## 2.3. Aspectos temporales de los neutrófilos

### 2.3.1. RITMOS GEOFÍSICOS

Las coordenadas espaciales de nuestro planeta le dotan de características geofísicas que tienen como efecto la existencia de patrones en la naturaleza con distintas **periodicidades**. La más evidente son los ciclos diarios causados por la rotación del planeta en torno a su eje, que producen cambios paulatinos y predecibles en la luz y la temperatura en las que los seres vivos se encuentran inmersos (Freedman & Kaufmann 2007). Dentro de esta categoría se encuentran los **ciclos diurnos** y circadianos, que tienen un periodo alrededor de 24 horas. Otros ciclos se superponen a éstos, como los debidos a la traslación del planeta en torno a su órbita elíptica alrededor de su estrella, y que dan lugar a los cambios estacionales, también paulatinos y predecibles, en cuya categoría se encuentran los ciclos circanuales. Además de los ciclos relacionados con la luz y la temperatura, hay muchos otros parámetros que siguen ciclos debido a las características geofísicas de la Tierra, como (aunque no restringidos a) la humedad, presión atmosférica, velocidad del viento, condensación y precipitación, radiación solar (fuera del espectro visible, como luz ultravioleta o partículas del viento solar), propiedades iónicas de la atmósfera y un largo etcétera (Tromp 1963).

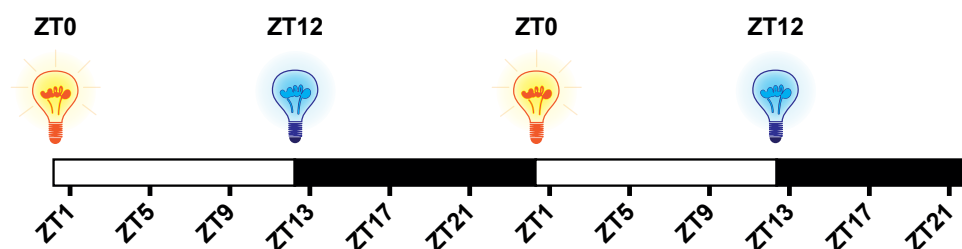
Los seres vivos a lo largo de la evolución se han beneficiado de la periodicidad y predictibilidad de dichos cambios para anticipar las condiciones cambiantes y obtener una ventaja evolutiva, por ejemplo para encontrar alimento o evitar patógenos (Edgar et al. 2012). Así, los seres vivos presentan **ritmos circadianos** que se aproximan a los ciclos luz/oscuridad, con una periodicidad de alrededor de 24 horas (24,18 horas en el caso de los humanos (Czeisler et al. 1999)) y que son parcialmente independientes de los acontecimientos externos, pues de este modo el organismo puede prever lo que ocurrirá en el medio independientemente de cambios transitorios. Es un sistema evolutivamente antiguo pues tenemos constancia de este tipo de mecanismos desde las cianobacterias (Dibner et al. 2010).

El primer ejemplo de un comportamiento circadiano estudiado en la literatura es de 1729. Jean-Jacques Dortous de Mairan observó el comportamiento de una planta helio-

tropa que extendía las hojas al salir el sol y las cerraba durante la noche, y notó que este comportamiento continuaba aún en total oscuridad (de Mairan 1729), de modo que estaba sincronizado con (pero no dependía directamente de) la radiación solar. Más tarde, Franz Halberg acuñó el término **circadiano** (del lat. *circa* ‘alrededor de’ y *dies* ‘día’) y dio origen a la cronobiología como rama que trata de comprender los fenómenos periódicos en los organismos vivos (Halberg et al. 1959). Las **características** más importantes de los ritmos circadianos son (Pittendrigh 1960):

1. Su periodo es una aproximación al periodo de rotación de la Tierra.
2. Son ubicuos en los sistemas vivos.
3. Son endógenos y generalmente auto-sostenidos.
4. Son innatos y ocurren autónomamente a nivel celular y organismal.
5. Son parcialmente independientes de la temperatura, pero dependientes de la luz.
6. Son reajustables (entrenables) por pistas periódicas ambientales.

Esas señales periódicas son, principalmente, la luz y la ingesta de alimentos. La luz tiene el papel preponderante para reajustar los ritmos circadianos. El biólogo alemán Jürgen Aschoff acuñó el término *zeitgeber* (del alemán *zeit* ‘tiempo’ y *geber* ‘el que da, dador’), para definir a esas señales periódicas (Aschoff 1954), y actualmente se utiliza el término ZT (de *zeitgeber time*) para denotar el comienzo de un particular estímulo que reajusta el ritmo circadiano. En la práctica experimental este término indica las horas que han pasado desde una señal dada. Por ejemplo, si se mantiene a los animales de experimentación en condiciones de 12 horas de luz y 12 de oscuridad (abreviado 12:12), el momento de encenderse la luz es ZT0, cinco horas después estaremos a ZT5 (significando, literalmente, 5 horas después del *zeitgeber*) y la luz se apagará a ZT12 (justo 12 horas después de comenzar), ZT13 será una hora después de apagarse la luz en un ciclo 12:12, y así sucesivamente, hasta que vuelva a encenderse la luz y volvamos a ZT0. Para una visualización gráfica de esta notación, véase la **Figura 9**.



**Figura 9: Representación típica de la escala de tiempo circadiano.** ZT es abreviatura de ‘*zeitgeber*’, es decir, cualquiera que sea el estímulo (típicamente la luz) que ajusta el ritmo; y el número indica las horas desde el comienzo de dicho estímulo. En el diagrama se muestran dos días consecutivos, con sus dos ciclos de luz y oscuridad bajo un régimen 12:12. Así, ZT0 coincide con el encendido de la luz y ZT12 con su apagado.

### 2.3.2. CRONOBIOLOGÍA: RITMOS CIRCADIANOS E INMUNIDAD

Los ritmos circadianos son evidentes a nivel del comportamiento de los organismos, por ejemplo, controlando los periodos de actividad motora y descanso. El simple acto de dormir aún a varios de estos *zeitgebers*, pues controla la recepción de luz, la actividad y la ingesta (Lange et al. 2010). Existen también ritmos de tipo circadiano en muchos de los componentes celulares de la inmunidad (Scheiermann et al. 2013). Las células en circulación presentan ritmos marcados y reproducibles tanto en su número como en su reactividad, y estos ritmos son genéticamente programados aunque se ajustan progresivamente a *zeitgebers* externos (Scheiermann et al. 2015; Haus et al. 1983). En el nicho hematopoyético de la médula ósea también se pueden encontrar parámetros que siguen ritmicidad circadiana (Méndez-Ferrer et al. 2008; Casanova-Acebes et al. 2013), incluyendo el número de células que producen CXCL12, un factor clave en este órgano. Múltiples parámetros inmunes siguen esta periodicidad, y distintos tipos celulares del sistema inmune tienen picos a distintas horas en circulación. Por ejemplo, en humanos, los linfocitos T tienden a ser más abundantes durante la noche, mientras que las células NK lo son durante el día (Lange et al. 2010).

Estas variaciones diarias en el número o actividad de las células inmunes correlacionan con ritmos en enfermedades conocidos en la clínica (Druzd et al. 2014), lo que incrementa el interés del estudio de la cronobiología del sistema inmune. Por ejemplo, **enfermedades con componentes autoinmunes** como la artritis reumatoide exhiben oscilaciones circadianas, con un pico durante la mañana tanto del dolor referido por los pacientes como de los niveles de citoquinas proinflamatorias (Cutolo & Straub 2008). Por el contrario, el asma tiene un comportamiento inverso, con peores síntomas y un aumento del número de eosinófilos al pulmón por la noche (Panzer et al. 2003). No solo las enfermedades con componente autoinmune muestran ritmos circadianos, sino que también lo muestran **procesos infecciosos** como la sepsis (Scheiermann et al. 2012). También los **eventos cardiovasculares** tienen comportamientos circadianos. Por ejemplo, el infarto de miocardio es más común durante la primera mitad del día que durante la noche (Muller et al. 2010; Parker et al. 1994) y, lo que es más interesante aún, la severidad de un infarto durante el día es mayor que durante la noche (Suarez-Barrientos et al. 2011). Asimismo, el ictus cerebral también muestra un comportamiento circadiano en varios parámetros, incluyendo el déficit cognitivo resultante (Manfredini et al. 2009).

En resumen, la inmunidad tiene comportamientos circadianos, tanto en sus componentes celulares o moleculares como en el resultado de la acción de los mismos.

### 2.3.3. LA INTERFAZ MUNDO FÍSICO – ORGANISMO

Si bien los ritmos circadianos son innatos y autogenerados, también hemos dicho que se ajustan y modulan como respuesta a señales ambientales. La interfaz entre estas señales ambientales y el organismo es lo que conocemos como **reloj central**. Éste reside en el sistema nervioso central, en el núcleo supraquiasmático (SCN, de *suprachiasmatic nuclei*). Ésta es una estructura bilateral del hipotálamo anterior (Klein & Moore 1991), que regula los comportamientos rítmicos locomotores (Stephan & Zucker 1972), la secreción hormonal y la duración del periodo del ritmo circadiano (Ralph et al. 1990). El SNC funciona a modo de oscilador o marcapasos, y sus aproximadamente 20000 neuronas mantienen un ritmo

de disparo circadiano aisladas en grupo (Inouye & Kawamura 1979) o incluso individualizadas en cultivo (Welsh et al. 1995).

El núcleo supraquiasmático recibe su *zeitgeber* particular, la información sobre los ciclos de luz/oscuridad, desde los ojos a través del tracto retinohipotalámico. Curiosamente, este no depende de conos y bastones, responsables de la información visual, sino de las células ganglionares de la retina, que proyectan directamente al SCN y poseen el fotopigmento melanopsina (Berson 2007), que es homólogo de un fotoreceptor en la piel de los anfibios (Provencio et al. 2000). Una vez en el SCN, esta información se traduce en cambios de expresión génica que incluyen al reloj molecular y, en última instancia, modifican el ritmo de disparo de las neuronas del SCN (Antle & Silver 2005).

A partir del SCN se modulan los llamados **relojes periféricos** en los distintos tejidos mediante señales humorales y neurales desde el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal. El núcleo paraventricular del hipotálamo recibe innervación desde el SCN y es capaz de inducir la producción de hormona corticotropa (Druzd et al. 2014) desde la glándula pituitaria, la cual coopera con el sistema nervioso simpático en regular la producción rítmica de hormonas (glucocorticoides como la hidrocortisona) desde la glándula adrenal (Scheiermann et al. 2013). La hidrocortisona se une al receptor de glucocorticoides, que está a su vez bajo el control del reloj molecular (Nader et al. 2009) y promueve la producción de moléculas antiinflamatorias e inhibe la de proinflamatorias (Elenkov & Chrousos 2000). Adicionalmente, el sistema nervioso simpático inerva directamente los tejidos y modula procesos circadianos mediante la liberación rítmica de catecolaminas (Scheiermann et al. 2012). Finalmente, algunos relojes periféricos se sincronizan con los ciclos de alimentación/ayuno o los de temperatura del organismo, ambos controlados por el SCN (Dibner et al. 2010). Ambos sistemas, el inmune y el nervioso, son críticos para la adaptación del organismo al medio, ambos tienen sistemas de memoria y están interrelacionados; el sistema nervioso inerva profusamente y ejerce control sobre los tejidos inmunes, y las células de ambos comparten receptores para mediadores de ambos sistemas (Lange et al. 2010), así como receptores de hormonas que median entre unos y otros. Por ejemplo, los ritmos de cortisol y adrenalina orquestados desde el SCN promueven la ritmicidad en las células T (Dimitrov et al. 2009). Entre los tejidos que tienen su propio reloj circadiano se incluyen el hígado, pulmón, riñón, bazo, páncreas, corazón, estómago, músculo esquelético, córnea, glándula tiroides y adrenal (Dibner et al. 2010).

Por tanto, el SNC establece un marcapasos oscilatorio o reloj central, capaz de sincronizarse con señales externas desde la retina, y capaz a su vez de ajustar distintos tejidos que, como el hígado (Langner & Rensing 1972), también muestran sus propios ritmos, los relojes periféricos. Existe, sin embargo, un tipo adicional de reloj, el que funciona no a nivel organismal o tisular, sino celular.

### 2.3.4. EL RELOJ MOLECULAR

Estos ritmos se sustentan a nivel celular en el llamado **reloj molecular**. Las neuronas del SCN tienen activo y modulan con la luz la expresión del reloj molecular, lo que podría en última instancia controlar al reloj central (Dibner et al. 2010). La base del reloj molecular es un sistema transcripcional-traducciona que consiste de varios factores de transcripción que actúan al unísono para formar un bucle de retroalimentación autorregulado. En última

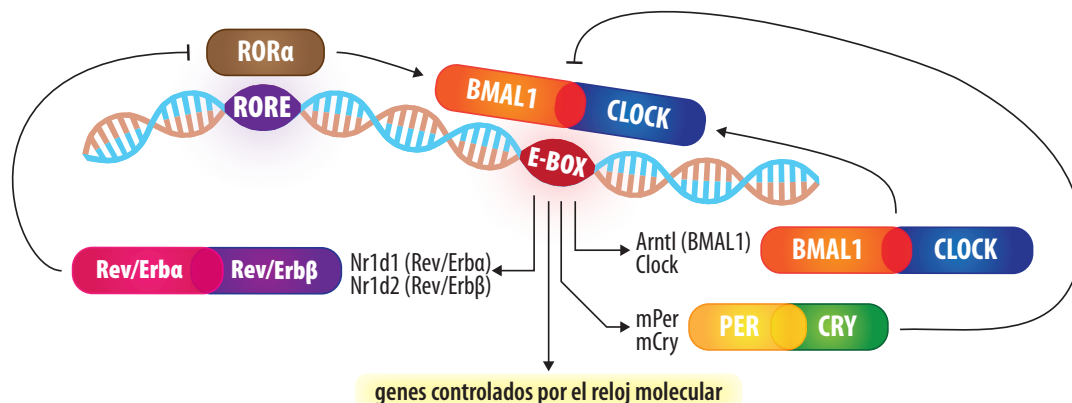
instancia, estos procesos conllevan la expresión rítmica de factores de transcripción que controlan la expresión de genes controlados por el reloj molecular y establecen una periodicidad de 24 horas (Druzd et al. 2014).

La **rama de retroalimentación positiva del bucle circadiano** comienza con la transcripción y traducción de los genes *Clock* y *Arntl*, que codifican para las proteínas **CLOCK** y **BMAL1**. Ambos factores forman un heterodímero (Gekakis et al. 1998) que, de vuelta en el núcleo, se une a la secuencia reguladora potenciadora “E-Box” (de *enhancer-box* en inglés) en la región promotora de los genes controlados por el reloj y activa su transcripción (Menet et al. 2014). Entre los genes que controla se encuentran los propios *Clock* y *Arntl*, que de este modo se autoperpetúan y constituyen la rama positiva del bucle circadiano (Shearman et al. 2000). De ambas, BMAL1 es la proteína esencial, pues es la única que, si es silenciada, provoca una pérdida total de los ritmos del reloj molecular (Bunger et al. 2000).

Otros genes del reloj molecular controlados por CLOCK y BMAL1 son los genes *Period* (*mPer1* y *mPer2*), que codifican para **Per1** y **Per2** (Gekakis et al. 1998) y los del criptocromo (*mCry1* y *mCry2*), que codifican para **Cry1** y **Cry2** (Kume et al. 1999). Éstas proteínas forman parte de la **rama de retroalimentación negativa del bucle circadiano** pues, una vez traducidas, heterodimerizan (formando el dímero PER:CRY) e interfieren directamente en la unión a los E-Box de CLOCK y BMAL1 con lo que, en última instancia, se reprimen a sí mismas porque su expresión es dependiente del heterodímero CLOCK:BMAL1 (Kume et al. 1999).

Cuando los niveles de CLOCK y BMAL1 caen, también caen los de Per y Cry, con lo que su efecto represor acaba y así se reinicia el ciclo promoviéndose una nueva oleada de expresión de CLOCK y BMAL1. Este ciclo dura aproximadamente 24 horas (Arjona et al. 2012). Un tercer nivel de control, a veces denominado **rama auxiliar de retroalimentación del bucle circadiano**, consiste en que CLOCK:BMAL1 promueve también la expresión de *Nr1d1* y *Nr1d2*, que codifican para REV-ERBa y REV-ERBβ, respectivamente. Ambas forman un heterodímero que inhibe la expresión de BMAL1 uniéndose a los elementos de respuesta RevErb/ROR (RORE) de su promotor (Preitner et al. 2002) por los que compite con RORα, que activa la transcripción de BMAL1 y CLOCK (Sato et al. 2004).

De esta forma se establece un circuito de retroalimentación positiva y negativa sobre unos factores de transcripción que, en última instancia, controlarán la expresión de los genes con una periodicidad circadiana. Para un resumen del reloj molecular, véase la **Figura 10**.



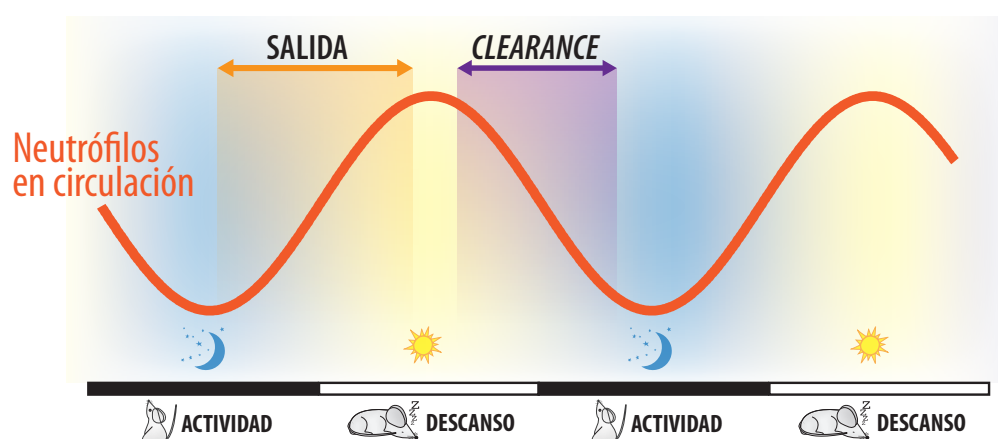
**Figura 10: El reloj molecular** consta de dos bucles principales, uno positivo que parte de los factores de transcripción Bmal1 y Clock, que dimerizan y promueven su propia



expresión, junto con la de toda una serie de genes controlados por el reloj molecular; y otro negativo que incluye *Per* y *Cry*, que interfieren en la unión de *Bmal1* y *Clock* a los E-Box en los promotores génicos, impidiendo su propia expresión. Cuando los niveles de *Per* y *Cry* bajan, *Bmal1* y *Clock* vuelven a arrancar el proceso. Asimismo, la expresión de *Bmal1* depende de *RORα*, y el bucle accesorio implica la expresión por *Bmal* y *Clock* de *Nr1d1* y *Nr1d2*, que evitan la unión de *RORα* a los elementos RORE del promotor, regulando así la expresión de *Bmal1* y el resto de los bucles.

### 2.3.5. RITMOS CIRCADIANOS EN LOS NEUTRÓFILOS

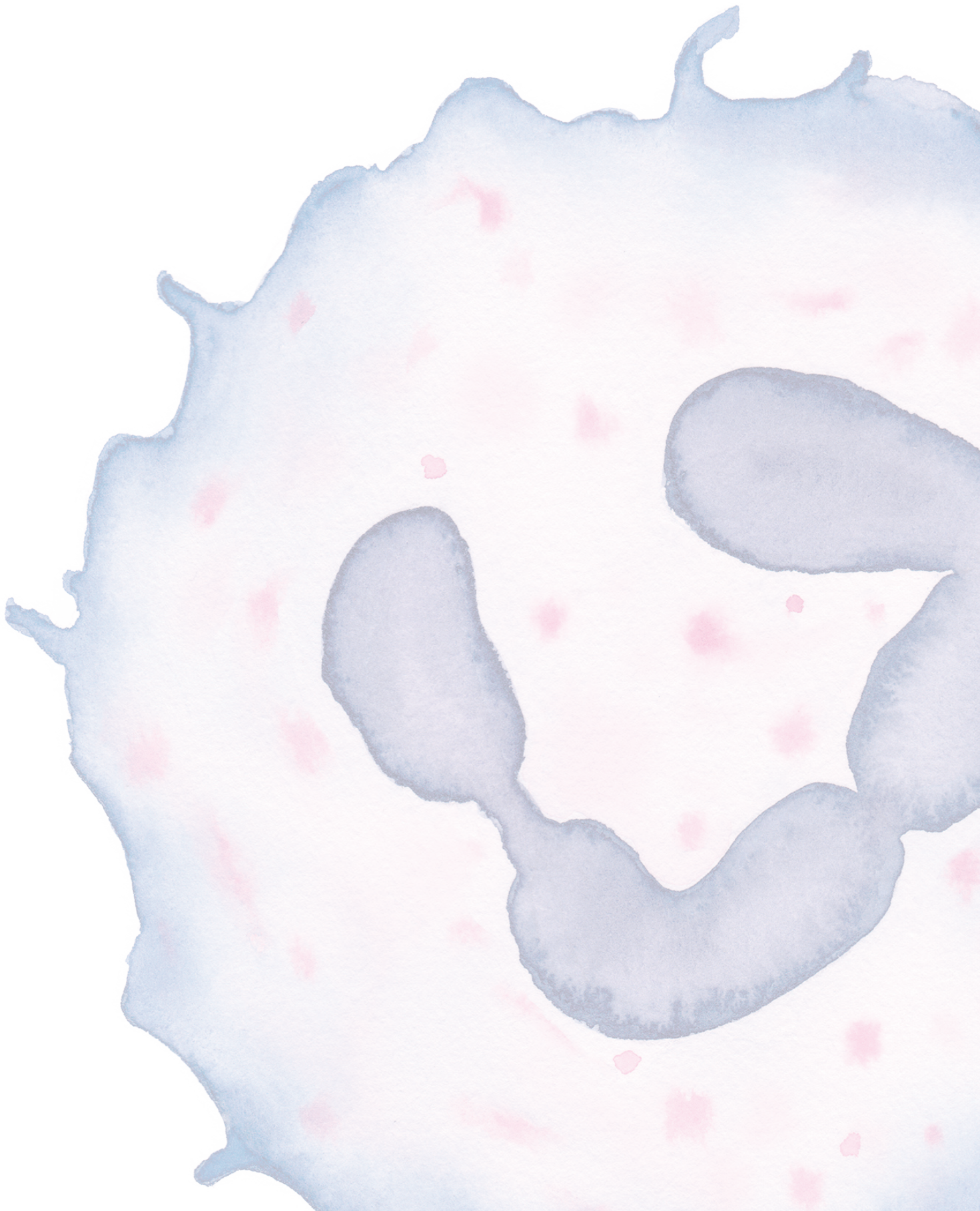
Aunque muchos componentes del sistema inmune muestran patrones circadianos, esta periodicidad es particularmente notable durante el ciclo vital de los neutrófilos. Se han descrito ritmos circadianos en el número de neutrófilos en circulación, que se relacionan con los cambios fenotípicos graduales asociados al envejecimiento de los neutrófilos. Así, en un régimen de luz 12:12, se definen dos fases en cuanto al número de neutrófilos en sangre en ratones (Casanova-Acebes et al. 2013): una **fase de salida** desde la médula ósea en la que los neutrófilos presentan un **fenotipo fresco** ( $CD62L^{HI}$ ,  $CXCR4^{LO}$ ) y su número va aumentando paulatinamente en circulación. Esta fase comienza durante la noche. Al tiempo que los neutrófilos se van acumulando en circulación se va produciendo el proceso de envejecimiento y cuando el número total de neutrófilos alcanza el pico máximo durante la mañana (concretamente a ZT5, es decir, 5 horas tras el encendido de la luz), también alcanzan un **fenotipo envejecido** ( $CD62L^{LO}$ ,  $CXCR4^{HI}$ ). Este proceso antecede a la **fase de clearance** o de eliminación de neutrófilos de la circulación, en la que el número de neutrófilos en sangre va disminuyendo paulatinamente desde ZT5 hasta ZT13 (por la tarde y primera hora de la noche). Por último, comenzará un nuevo ciclo con la salida de nuevos neutrófilos desde la médula y el arranque del proceso de envejecimiento. Para un esquema de este proceso véase la **Figura 11**.



**Figura 11: Ritmos en el número de neutrófilos en circulación.** Los neutrófilos siguen un ritmo circadiano de salida de la médula durante la noche con un fenotipo fresco y consecuente aumento de su número en sangre. A medida que se acumulan en circulación sufren el proceso de envejecimiento, y durante el día hay elevados niveles de neutrófilos en circulación, con un fenotipo envejecido. Por la tarde los números comienzan a disminuir en la fase de *clearance* o de eliminación de los neutrófilos de la circulación y durante la noche se reinicia el ciclo con una nueva fase de salida. Ilustración modificada de (Adrover et al. 2016).



### 3. Objetivos





### 3.1. Objetivos

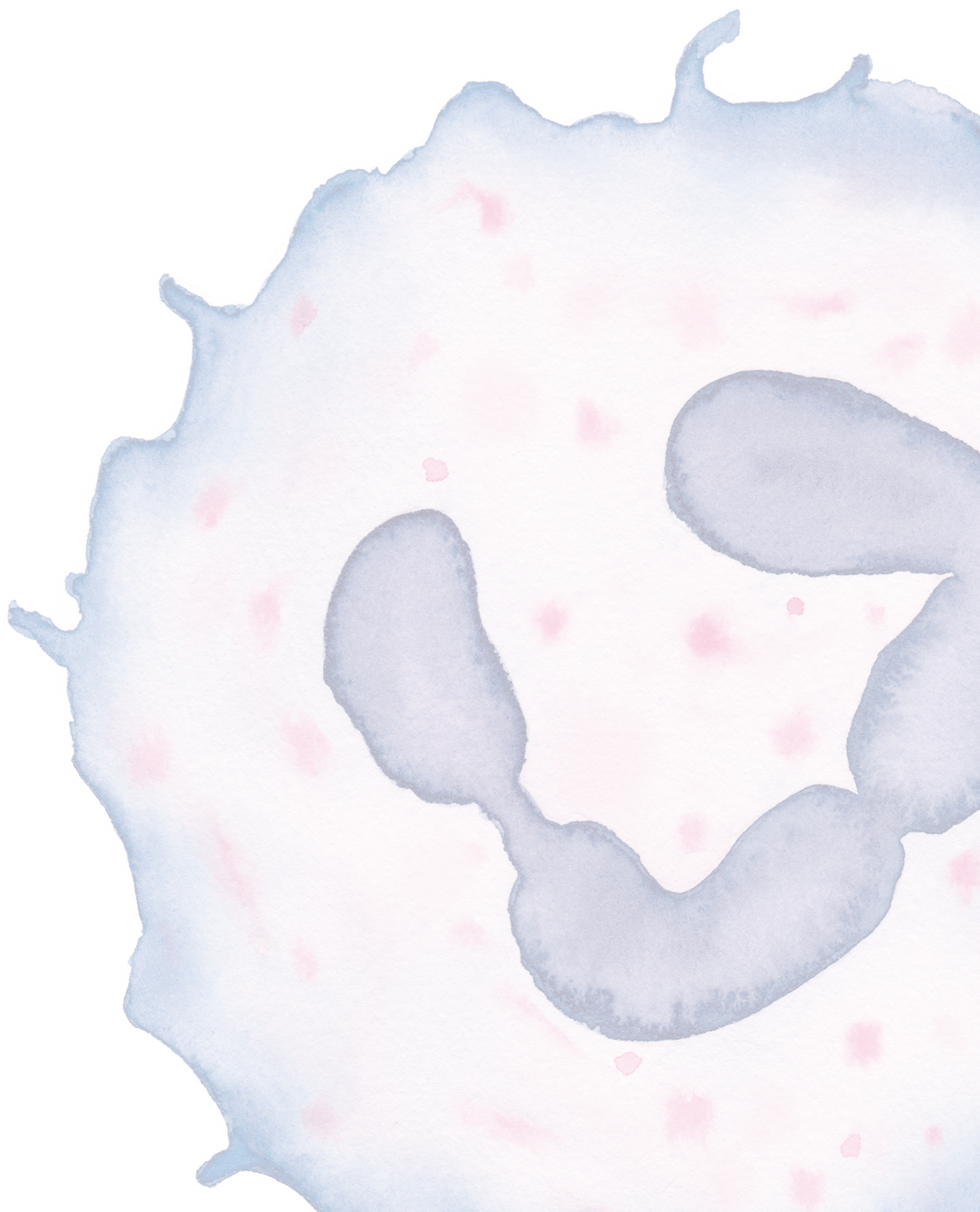
**E**l objetivo general de este trabajo es el análisis del proceso de envejecimiento de los neutrófilos, su regulación y sus consecuencias, tanto en homeostasis como en condiciones inflamatorias. Los objetivos concretos son:

1. Estudiar mecanísticamente el proceso de envejecimiento a nivel fenotípico y transcriptómico, y dilucidar si se trata de un programa celular extrínseco o intrínseco.
2. Analizar si el proceso de envejecimiento y el de eliminación homeostática de la circulación (clearance) están causalmente conectados, y en su caso, de qué manera.
3. Estudiar las consecuencias del envejecimiento de neutrófilos sobre su capacidad de infiltrar tejidos inflamados.
4. Analizar la contribución del proceso de envejecimiento de neutrófilos en modelos de infección e inflamación con relevancia clínica.





## 4. Resultados





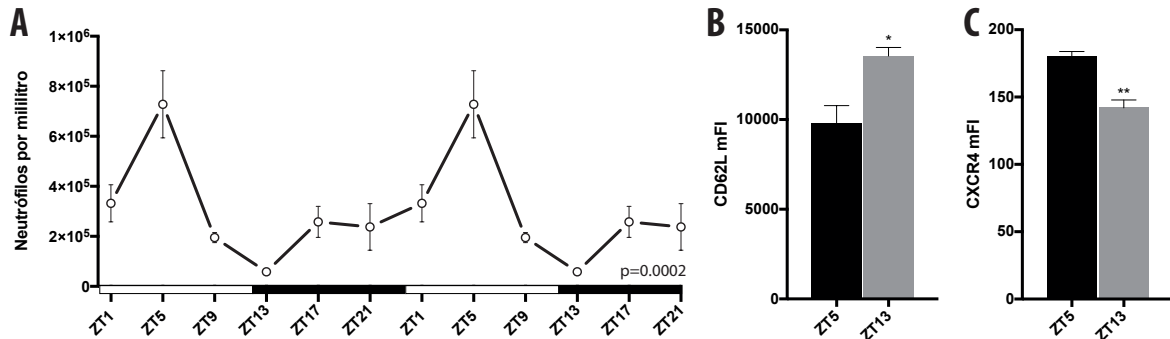
## 4.1. Análisis del proceso de envejecimiento de los neutrófilos

Este trabajo parte de observaciones previas del grupo que demostraron que el número de neutrófilos en circulación muestra un comportamiento oscilatorio circadiano, coincidente con cambios fenotípicos en marcadores de superficie de los neutrófilos. Este estudio inicial demostró que los neutrófilos que se liberan de médula ósea durante la noche se caracterizan por un fenotipo “fresco” (CD62L<sup>HI</sup>, CXCR4<sup>LO</sup>), y sufren el proceso de envejecimiento en circulación, de modo que durante el día muestran un fenotipo “envejecido” (CD62L<sup>LO</sup>, CXCR4<sup>HI</sup>). El término de envejecimiento se adoptó porque se observó que la población CD62L<sup>HI</sup> da lugar a la población CD62L<sup>LO</sup> a lo largo del tiempo (Casanova-Acebes et al. 2013).

### 4.1.1. EL ENVEJECIMIENTO DE LOS NEUTRÓFILOS ES UN PROCESO TEMPORALMENTE REGULADO

Con el objetivo de analizar en profundidad el proceso de envejecimiento de los neutrófilos, comenzamos por extraer ARN de neutrófilos purificados a ZT5 (5 horas tras el encendido de la luz) y a ZT13 (una hora tras el apagado de la luz), pues esos dos puntos marcan el máximo respectivo de neutrófilos envejecidos (ZT5) y frescos (ZT13) en circulación. Antes de extraer el ARN, corroboramos la fluctuación circadiana del número de neutrófilos en circulación (**Figura 12A**) analizando su número cada cuatro horas durante 24 horas. Para comprobar estadísticamente el comportamiento circadiano de los datos hemos diseñado un test que llamamos “test de amplitud contra cero” en el que comparamos la amplitud de la fluctuación de los datos modelada como una curva sinusoidal con un periodo de 24h (ajuste COSINOR (Cornelissen 2014)) con una hipotética curva de amplitud cero (es decir, carente de comportamiento circadiano) pero idéntica desviación (para más detalles

consúltese la sección de métodos). Comprobamos también la fluctuación de los marcadores de envejecimiento CD62L (**Figura 12B**) y CXCR4 (**Figura 12C**) por citometría a ZT5 y ZT13 en animales tipo silvestre (en adelante WT, del inglés *wild type*).



**Figura 12: Fluctuación del número y fenotipo de los neutrófilos en sangre. A)** Fluctuación circadiana del número de neutrófilos en circulación. **B)** y **C)** Intensidad mediana de fluorescencia de CD62L (B) y CXCR4 (C) a ZT5 (neutrófilos envejecidos) y ZT13 (neutrófilos frescos). N=3-5 ratones por punto. Estadística: test de amplitud contra cero (A) y test t de Student no pareado (B-C). \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ .

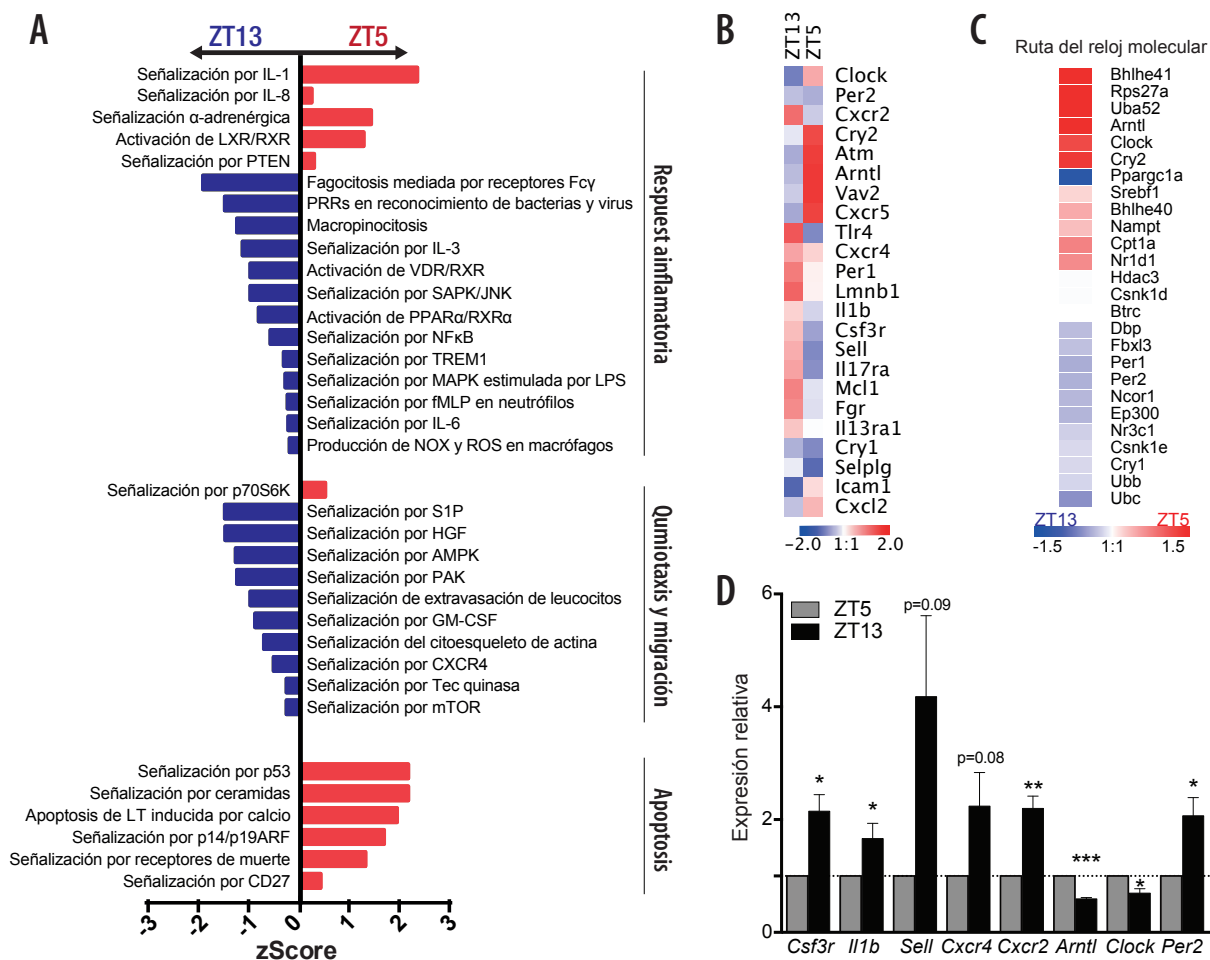
Para identificar los programas genéticos regulados temporalmente en los neutrófilos en situación basal (es decir, en ausencia de inflamación), realizamos una secuenciación masiva (RNAseq) del ARN extraído a ZT5 (neutrófilos envejecidos) y ZT13 (neutrófilos frescos). Este análisis tenía el objetivo adicional de determinar si los cambios fenotípicos que observamos a lo largo del tiempo en los neutrófilos circulantes tienen como origen un programa transcripcional completo, o se trata simplemente de cambios discretos en ciertos marcadores de superficie, como se había descrito hasta la fecha ([Adrover et al. 2016](#)). De esta forma identificamos cambios en más de 1300 genes relacionados con rutas moleculares asociadas principalmente a inflamación, apoptosis, migración y quimiotaxis (**Figura 13A-B**, para una lista completa véase el anexo 1, **Tabla 5**). Esto sugiere que el proceso de envejecimiento de los neutrófilos es un programa transcripcional completo. Corroboramos los resultados del RNAseq por PCR cuantitativa para un grupo selecto de genes (**Figura 13D**).

A partir de este análisis transcriptómico examinamos la expresión de algunos genes de interés (**Figura 13B**) incluyendo *Sell* (que codifica para CD62L), *Cxcr4* y *Cxcr2*, entre otros. El perfil transcriptómico de CD62L coincidió con su expresión verificada a nivel de proteína por citometría (**Figura 12B**), e indicó que la regulación a la baja durante el envejecimiento de los niveles de L-selectina tiene en parte un componente transcripcional. Sin embargo, los niveles de CXCR4 no cambiaron mucho entre los dos tiempos a nivel transcripcional mientras que si lo hacían a nivel de proteína (**Figura 12C**), lo que sugiere que la regulación de este receptor ocurre de manera post-traducciona, quizá gracias a la presencia de un reservorio intracelular en compartimentos membranosos como los gránulos o por internalización del receptor al unir su ligando. La regulación del gen de CXCR2 mostró el mismo patrón que CD62L, es decir, un nivel más elevado en neutrófilos frescos que en neutrófilos envejecidos. Esto es potencialmente interesante dada la relación de inhibición mutua que este receptor presenta con CXCR4, y que se ha descrito en neutrófilos de la médula ósea ([Martin et al. 2003](#)), así como por el incremento de los niveles de CXCR4 a nivel de proteína en los neutrófilos envejecidos. Hipotetizamos que estos dos receptores



de quimioquinas podrían tener un papel en el proceso de envejecimiento de los neutrófilos por dos razones: (1) tienen una acción antagónica en cuanto a la retención de los neutrófilos en la médula ósea (Eash et al. 2010b), y (2) muestran patrones de expresión antagónicos en neutrófilos frescos y envejecidos en circulación (Figura 12).

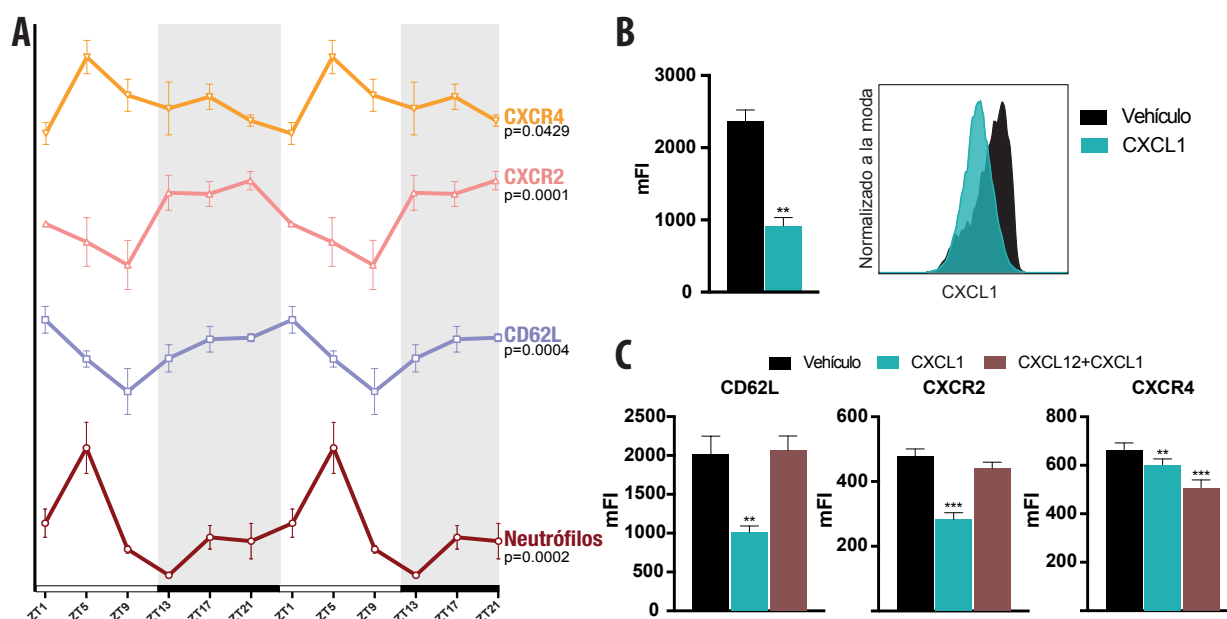
Dada la naturaleza circadiana del proceso de envejecimiento, decidimos analizar la ruta del reloj molecular (Figura 13C) para determinar si este mecanismo celular de regulación temporal podría estar activo en neutrófilos circulantes. Encontramos que la expresión de varios de los genes del reloj molecular mostraban diferencias entre los neutrófilos frescos y envejecidos. Estos incluían *Arntl* (que codifica para Bmal1) y *Clock*, más expresados a ZT5; y los reguladores *Per1*, *Per2* y *Cry1*, más expresados a ZT13. Esto indica que los neutrófilos tienen activo el reloj molecular, y, por lo tanto, éste podría tener un papel en el proceso de envejecimiento.



**Figura 13: Análisis transcriptómico** de neutrófilos frescos (ZT13) y envejecidos (ZT5) de animales WT. **A)** Análisis de las rutas bioquímicas activas diferencialmente en neutrófilos frescos y envejecidos. **B)** Mapa comparativo (heatmap) de la expresión de algunos genes de interés. **C)** Expresión diferencial de los genes de la ruta del reloj molecular que han sido identificados en nuestra secuenciación. **D)** Validación por qPCR de una selección de genes. N=3-7. Estadística: test t de Student no pareado (D). \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ .

### 4.1.2. IMPLICACIÓN DE RECEPTORES DE QUIMIOQUINAS EN EL ENVEJECIMIENTO

En base a estos datos, hipotetizamos que los receptores de quimioquinas CXCR2 y CXCR4 podrían tener un papel en el proceso de envejecimiento de los neutrófilos, y que éste podría estar adicionalmente controlado por el reloj molecular, cuya proteína más importante es Bmal1. Para comprobar la utilidad de CXCR2 como un marcador de envejecimiento, analizamos su expresión circadiana en superficie mediante citometría de flujo, simultáneamente con la de los marcadores usuales CD62L y CXCR4 (**Figura 14A**). Observamos que a nivel de proteína, al igual que lo que ocurría en los datos de secuenciación, CXCR2 y CD62L tienen un comportamiento similar, con niveles más elevados en los neutrófilos frescos (durante la noche), mientras que CXCR4 tiene un comportamiento inverso, con niveles más altos en neutrófilos envejecidos (durante el día). En base a este resultado decidimos utilizar CXCR2 como un nuevo marcador adicional del proceso circadiano de envejecimiento de los neutrófilos.



**Figura 14: CXCR2 y CXCR4 en el proceso de envejecimiento de los neutrófilos.**

**A)** Fluctuación circadiana de la expresión en superficie de CXCR4, CXCR2, CD62L y del número neutrófilos en sangre. Se tomaron muestras cada 4h durante 24h. N=4-5 por tiempo. **B)** Análisis de los niveles de CD62L en neutrófilos tratados *ex vivo* con CXCL1. Intensidad mediana de fluorescencia (izquierda) e histograma representativo (derecha) N=4. **C)** Envejecimiento *ex vivo* de neutrófilos no tratados, tratados con CXCL1 o con CXCL12 y CXCL1. Se analizaron los niveles en superficie de CD62L, CXCR2 y CXCR4. N=8. Estadística: test de amplitud contra cero (A), test t de Student pareado (B) y ANOVA (C). \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ .

El fenotipo de los neutrófilos CD62L<sup>LO</sup> se asemeja al de células activadas por múltiples agonistas (Lard et al. 1999). En experimentos *ex vivo* comprobamos que la estimulación con CXCL1, el principal ligando de CXCR2, produce una caída de los niveles de CD62L

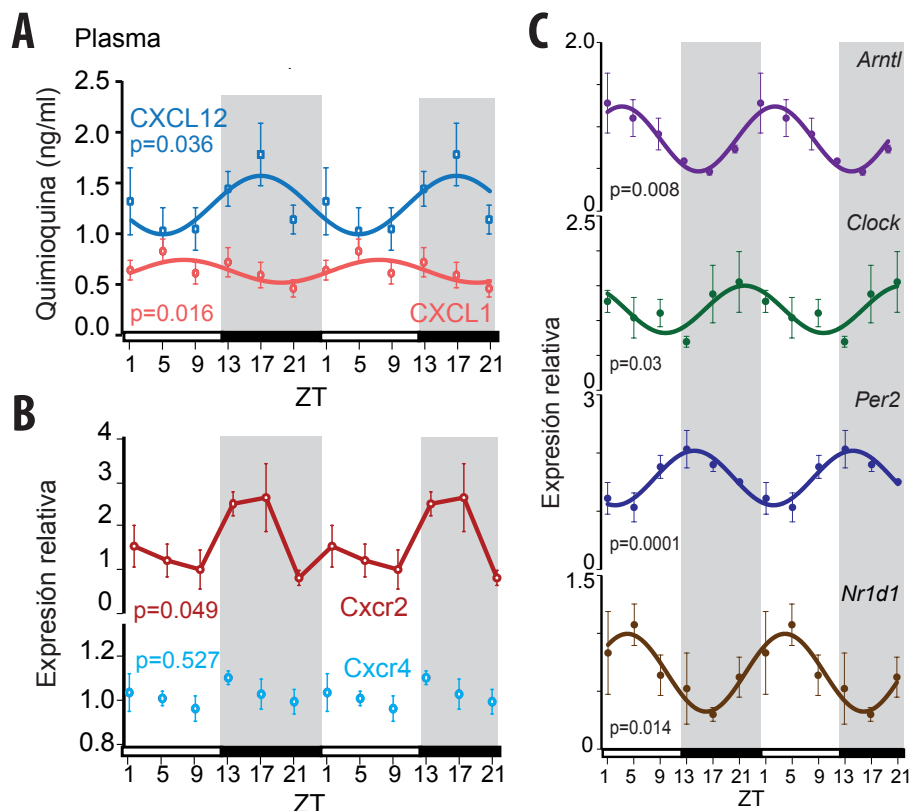
que recapitula el fenotipo de envejecimiento natural de los neutrófilos en circulación (**Figura 14B**), lo que apoya la hipótesis de que este receptor está implicado en este proceso. Por otro lado, la oscilación circadiana de CXCR4 y el papel inhibitorio de este receptor sobre CXCR2 ([Eash et al. 2010](#)), sugieren que este receptor también podría tener un papel en el proceso. Esta inhibición se ha demostrado en médula ósea, donde CXCR4 inhibe y CXCR2 promueve la salida de neutrófilos hacia la sangre. Para comprobar si esta inhibición también afectaba a los parámetros de envejecimiento de los neutrófilos, realizamos una serie de experimentos de envejecimiento *ex vivo* usando neutrófilos WT no tratados, tratados con CXCL1 o con CXCL1 y CXCL12 (**Figura 14C**). Corroboramos que la estimulación de CXCR2 con CXCL1 reproduce la caída de CD62L y CXCR2 que se observa en el envejecimiento natural de los neutrófilos, y que esta caída se inhibe completamente si se estimula CXCR4 con CXCL12. Por tanto, la señalización a través de CXCR2 reproduce el fenotipo de los neutrófilos envejecidos, mientras que la señalización a través de CXCR4 la impide. Esto sugiere que CXCR2 podría promover el envejecimiento de los neutrófilos, un proceso que estaría antagonizado por la señalización a través de CXCR4.

Puesto que tanto CXCR2 como CXCR4 son receptores de quimioquinas, y conforme a la observación de que el envejecimiento ocurre naturalmente en sangre, decidimos analizar la presencia de sus ligandos en plasma de animales en estado basal. Para ello tomamos muestras de plasma de animales WT cada 4 horas durante 24 horas y analizamos la presencia de CXCL1 y CXCL12 (**Figura 15A**). Observamos que la expresión de CXCL12 mostraba un marcado patrón circadiano, siendo máxima durante la noche, mientras que la expresión de CXCL1 mostraba una fluctuación pequeña, aunque significativa, en antifase con la de CXCL12, y en fase con niveles bajos de CXCR2 en neutrófilos. Por tanto, la señalización a través de CXCR4 en circulación es máxima durante la noche, en correlación con el fenotipo fresco de los neutrófilos. Puesto que la señalización a través de CXCR4 inhibe la señalización a través de CXCR2 (**Figura 14C**), los niveles mínimos de CXCL12 junto con el aumento de CXCL1 sugieren que la señalización por CXCR2 es máxima durante el día, en perfecta sincronía con el fenotipo envejecido de los neutrófilos.

En conjunto, los datos sugieren que el proceso de envejecimiento de los neutrófilos estaría controlado por la señalización antagonista de los receptores de quimioquinas CXCR2, que promovería el proceso de envejecimiento, y CXCR4, que se opondría a este proceso. La modulación circadiana de los niveles de los principales ligandos de estos receptores en plasma podría estar controlando, por tanto, el proceso de envejecimiento.

En nuestros análisis de secuenciación masiva también observamos cambios en los niveles de expresión de CXCR2, pero no en los de CXCR4. Para comprobarlo, analizamos por PCR cuantitativa en tiempo real muestras de ARN de neutrófilos tomados a distintos puntos del día, cada 4h durante 24h (**Figura 15B**). Pudimos corroborar que la expresión de CXCR2 tiene un comportamiento circadiano, pero no así CXCR4, que fluctúa solamente a nivel de proteína (**Figura 14A**) pero no de transcrito. Esto sugiere que la reducción en CXCR4 se deba a internalización tras la unión de CXCL12 ([Rey et al. 2007](#)). Que estos receptores fluctúen podría indicar que el control del proceso de envejecimiento no se debe únicamente a los ligandos en plasma (exógenos) sino también intrínsecos a la célula. En conjunto, estos datos apoyan la hipótesis de que estos dos receptores participan en el proceso de envejecimiento de los neutrófilos.

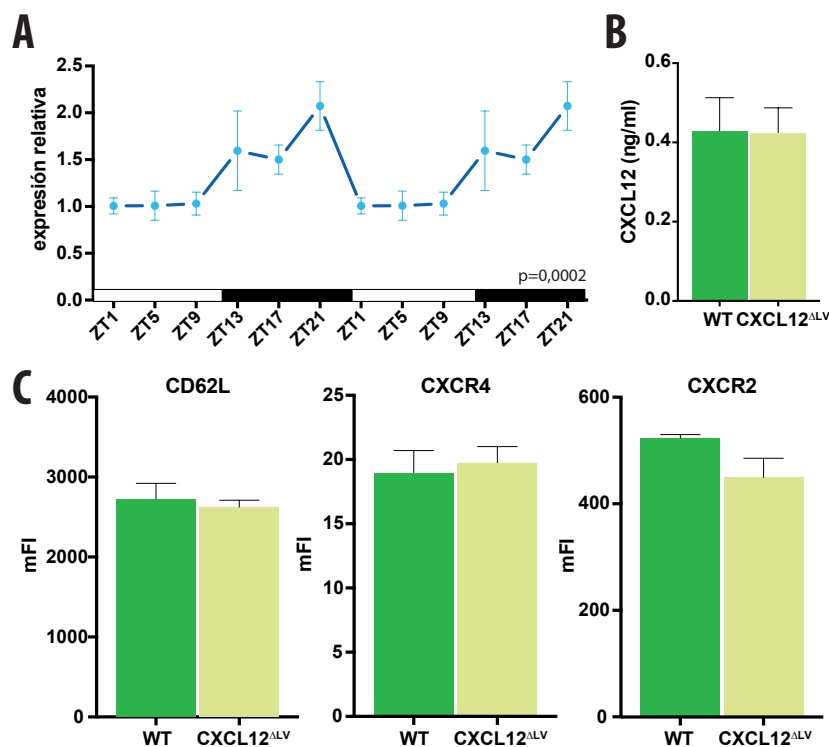
En los análisis de secuenciación masiva observamos cambios en genes del reloj molecular entre los neutrófilos frescos y envejecidos. Para confirmarlos realizamos análisis de qPCR en muestras de ARN de neutrófilos tomadas a distintos momentos del día (**Figura 15C**). Todos los genes que analizamos mostraron un comportamiento oscilatorio circadiano, incluyendo a *Arntl* (que codifica para Bmal1), *Clock*, *Per2* y *Nr1d1*. Esto indica que la maquinaria del reloj circadiano está activa en los neutrófilos. En concreto, el regulador principal, Bmal1, mostró un máximo de expresión durante el día que coincide con el máximo envejecimiento en los neutrófilos.



**Figura 15: Análisis circadianos de quimioquinas en plasma y de expresión relativa de genes del reloj molecular. A)** Oscilación circadiana de los niveles de ligandos de CXCR2 (CXCL1) y CXCR4 (CXCL12) en plasma. N=5-10 por tiempo. **B)** Expresión relativa de *Cxcr2* y *Cxcr4* a lo largo del tiempo en neutrófilos en circulación por qPCR. N=2-6 por tiempo. **C)** Expresión relativa de *Arntl* (Bmal1), *Clock*, *Per2* y *Nr1d1* en neutrófilos en circulación por qPCR. N=2-6 por tiempo. Estadística: test de amplitud contra cero.

Puesto que el proceso de envejecimiento de neutrófilos parecía guiado por la presencia de agonistas de CXCR4 en sangre, tratamos de encontrar la fuente de las variaciones circadianas en los niveles de CXCL12 en plasma (**Figura 15A**). Hipotetizamos que una posible fuente podría ser el hígado, pues estudios previos del laboratorio habían demostrado expresión de esta quimioquina en hepatocitos (no mostrado). Para verificarlo, decidimos analizar primero la expresión circadiana de CXCL12 por PCR cuantitativa (qPCR) en extractos de ARN de hígado tomados cada 4h durante 24h. Observamos una fluctuación similar a la de plasma, con mayores niveles de expresión durante la noche (**Figura 16A**). Para corroborar si los hepatocitos eran la fuente de las variaciones de CXCL12 en plasma cruzamos

ratones CXCL12<sup>fl/fl</sup> con animales Alb<sup>CRE</sup> para eliminar el gen de CXCL12 específicamente en hepatocitos (ratones CXCL12<sup>ΔLV</sup>) usando el sistema de recombinación Cre-loxP (Sauer & Henderson 1988). Cuando analizamos los niveles de CXCL12 en plasma de estos animales y los comparamos con los animales WT no observamos, sin embargo, diferencias (Figura 16B). Tampoco observamos ninguna diferencia en el fenotipo de envejecimiento entre los neutrófilos de los animales WT y CXCL12<sup>ΔLV</sup> por citometría de flujo (Figura 16C). Esta observación nos permite descartar el hígado como fuente de las variaciones de CXCL12 en plasma, y sugiere la existencia de otra fuente de esta quimioquina que regula el fenotipo de neutrófilos durante el día.



**Figura 16: El hígado no es la fuente de CXCL12 en plasma. A)** La expresión de CXCL12 en hígado medida por qPCR muestra una fluctuación circadiana. N=2-3 por punto. **B)** La eliminación de CXCL12 en hígado no modifica los niveles de esta quimioquina en plasma. N=5. **C)** La eliminación de CXCL12 específicamente en hepatocitos (ratones CXCL12<sup>ΔLV</sup>) no afecta al fenotipo de envejecimiento de los neutrófilos medido por citometría de flujo. N=4. Estadística: test de amplitud contra cero (A) y test t de Student (B-C).

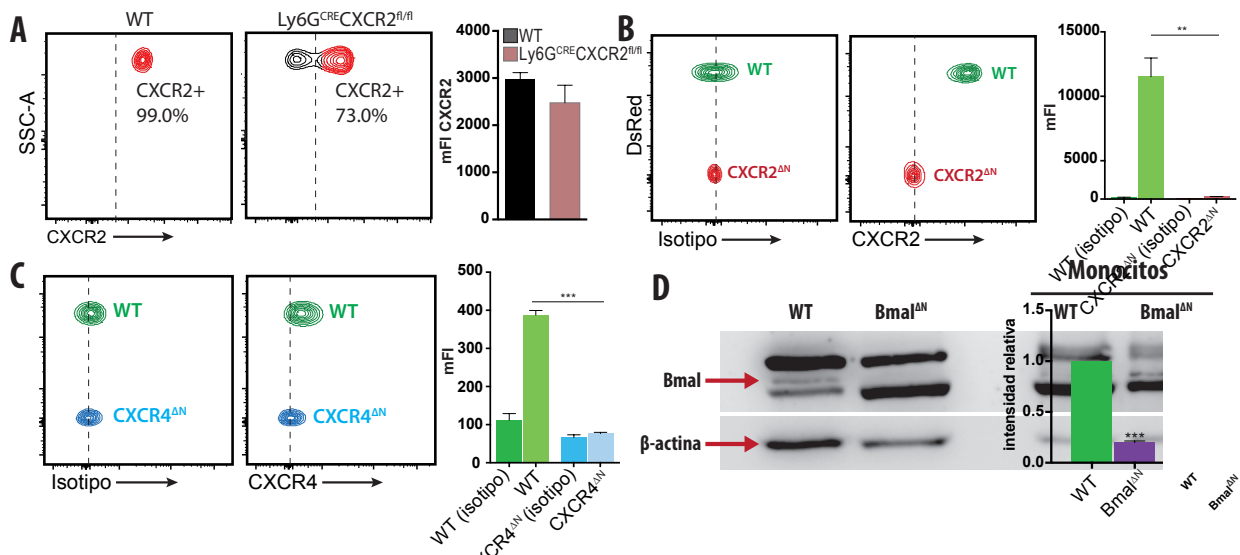
### 4.1.3. GENERACIÓN DE MODELOS GENÉTICOS DE ENVEJECIMIENTO

Para confirmar el papel de CXCR2, CXCR4 y Bmal1 en el proceso de envejecimiento de los neutrófilos, decidimos generar ratones deficientes en los genes (*Cxcr2*, *Cxcr4* y *Arntl*, respectivamente) que codifican para esas proteínas de manera neutrófilo-específica. Utili-



zamos ratones con esos genes flanqueados por secuencias loxP para eliminar el gen cruzándolos con ratones que expresen la recombinasa Cre de forma restringida a los neutrófilos.

Para conseguir edición génica específicamente en neutrófilos, nos planteamos inicialmente el uso de dos líneas distintas,  $Ly6G^{CRE}$  y  $Mrp8^{CRE}$ . Aunque la recombinasa Cre bajo el control del promotor de  $Ly6G$  (*driver*  $Ly6G$ ) se ha descrito como altamente específica de neutrófilos (Hasenberg et al. 2015), observamos que es poco eficiente para la edición de genes en neutrófilos circulantes *in vivo*, como muestra la elevada proporción de neutrófilos que mantienen expresión de CXCR2 en animales  $Ly6G^{CRE}CXCR2^{fl/fl}$  (Figura 17A). En consecuencia, utilizamos los animales con el *driver*  $Mrp8^{CRE}$ , que permite eliminar genes flanqueados por secuencias loxP de manera altamente eficiente en los neutrófilos (Passequé et al. 2004), y con mucha especificidad (Abram et al. 2014). De esta forma logramos una eliminación eficaz de  $Cxcr2$  (Figura 17B),  $Cxcr4$  (Figura 17C) y  $Arntl$  (Figura 17D) de manera neutrófilo-específica para generar las líneas de ratones que denominaremos a partir de ahora  $CXCR2^{\Delta N}$ ,  $CXCR4^{\Delta N}$  y  $Bmal1^{\Delta N}$ .

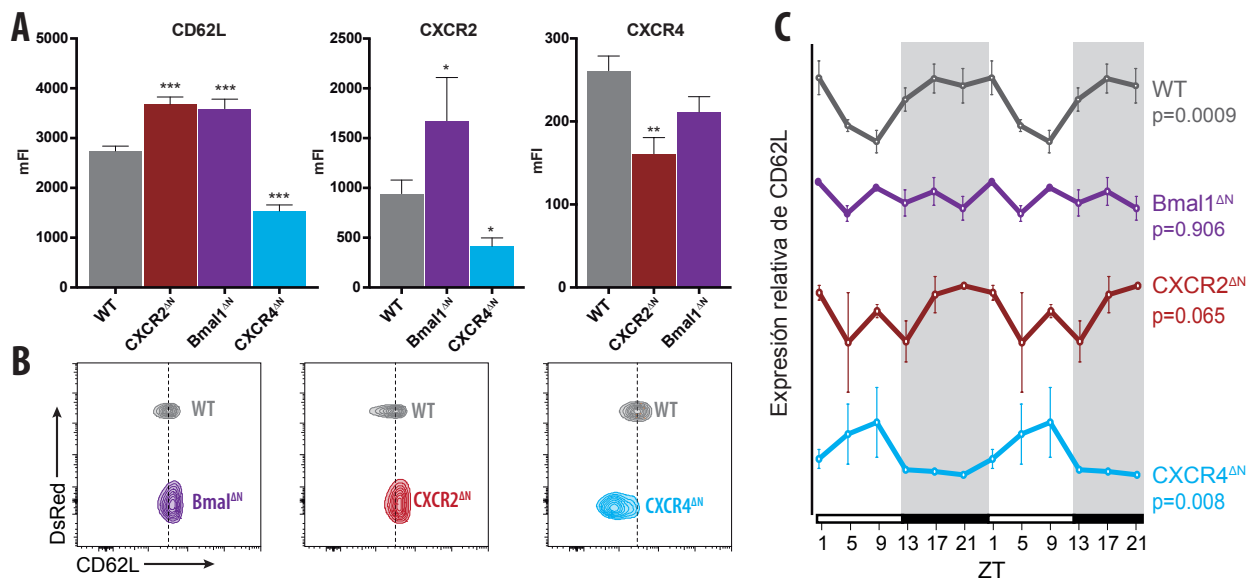


**Figura 17: Generación de animales neutrófilo-deficientes en CXCR2, CXCR4 y Bmal1.** **A)** Gráficos representativos de citometría indicando la proporción de neutrófilos que expresan CXCR2 en animales WT control y  $Ly6G^{CRE}CXCR2^{fl/fl}$ . N=4. **B)** Niveles de fluorescencia y gráficos representativos del marcaje con un anticuerpo isotípico o contra CXCR2 en animales  $Mrp8^{CRE}CXCR2^{fl/fl}$  ( $CXCR2^{\Delta N}$ ) N=3. **C)** Niveles de fluorescencia y gráficos representativos del marcaje con un anticuerpo isotípico o contra CXCR4 en animales  $Mrp8^{CRE}CXCR4^{fl/fl}$  ( $CXCR4^{\Delta N}$ ) N=3. Los análisis en B) y C) se hicieron en animales quiméricos de donantes mutantes y WT-DsRED. **D)** Western blot de proteína total extraída de neutrófilos WT y  $Mrp8^{CRE}Arntl^{fl/fl}$  ( $Bmal1^{\Delta N}$ ) con un anticuerpo contra Bmal1. N=3. Estadística: test t de Student no pareado. \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ .

Una vez establecidas líneas de animales que carecen de la expresión de estos genes en neutrófilos estudiamos si éstos tienen un papel en el proceso fisiológico de envejecimiento. Para ello generamos animales quiméricos por trasplante de médula ósea, utilizando como donantes simultáneos animales WT reporteros que expresan constitutivamente la proteína fluorescente DsRed (en adelante WT-DsRED) y animales mutantes. De esta manera

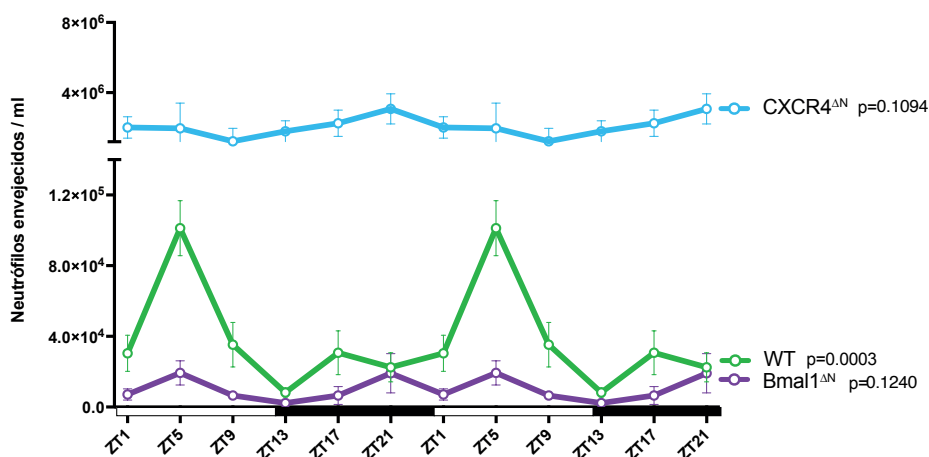
podimos evaluar el fenotipo de envejecimiento en neutrófilos WT y mutantes de manera simultánea y en el mismo entorno, evitando posibles distorsiones derivadas, por ejemplo, del estado del animal mutante.

Observamos que la eliminación de CXCR2 y de Bmal1 resultaba en un fenotipo CD62L<sup>HI</sup> fresco en los neutrófilos, mientras que la eliminación de CXCR4 provocaba un fenotipo CD62L<sup>LO</sup> envejecido (**Figura 18A-B**). Estos datos confirmaron los experimentos *ex vivo* e indicaron que el reloj molecular promueve el envejecimiento de los neutrófilos, al igual que CXCR2, mientras que CXCR4 actúa inhibiendo dicho proceso. Además de testar los niveles de CD62L, decidimos analizar también el patrón de este marcador en los neutrófilos Bmal1<sup>ΔN</sup>, CXCR2<sup>ΔN</sup> y CXCR4<sup>ΔN</sup> como medida del control temporal del envejecimiento (**Figura 18C**). Notablemente, observamos que el patrón temporal normal de oscilación en los neutrófilos WT estaba desorganizado en todos los mutantes.



**Figura 18: Los neutrófilos CXCR2<sup>ΔN</sup> y Bmal1<sup>ΔN</sup> muestran un fenotipo fresco, y los CXCR4<sup>ΔN</sup> envejecido.** **A)** Análisis por citometría de flujo de los marcadores de envejecimiento en neutrófilos CD62L, CXCR2 y CXCR4 en animales quiméricos por trasplante de médula ósea de animales WT-DsRED y mutantes. Intensidad mediana de fluorescencia de CD62L, CXCR2 y CXCR4. N=14-30 animales por grupo. **B)** Gráficos de densidad por citometría de flujo representativos de los niveles de CD62L en quimeras con los tres mutantes. **C)** Oscilación circadiana de CD62L en animales WT y mutantes. Nótese que el patrón oscilatorio de los animales WT está desorganizado en los mutantes. N=3-10 ratones por punto. Estadística: ANOVA de una vía (A) o test de amplitud contra cero (C). \*, p<0.05; \*\*, p<0.01; \*\*\*, p<0.001.

Estos datos son consistentes con los anteriores, y demuestran que Bmal1 y CXCR2 promueven, mientras que CXCR4 frena, el proceso de envejecimiento de los neutrófilos. Efectivamente, cuando analizamos los números de neutrófilos envejecidos en los distintos mutantes encontramos éstos perdían los patrones oscilatorios característicos de los animales WT, que presentaban un pico a ZT5 (**Figura 19**). Para este cálculo utilizamos el porcentaje de neutrófilos con baja expresión de CD62L obtenido por citometría sobre el número total de neutrófilos en circulación obtenido por hematología.



**Figura 19: Número de neutrófilos envejecidos en circulación**, calculados en base al porcentaje de neutrófilos CD62L<sup>LO</sup> obtenido por citometría de flujo en distintos momentos del día en animales WT, Bmal1 $\Delta N$  y CXCR4 $\Delta N$ .

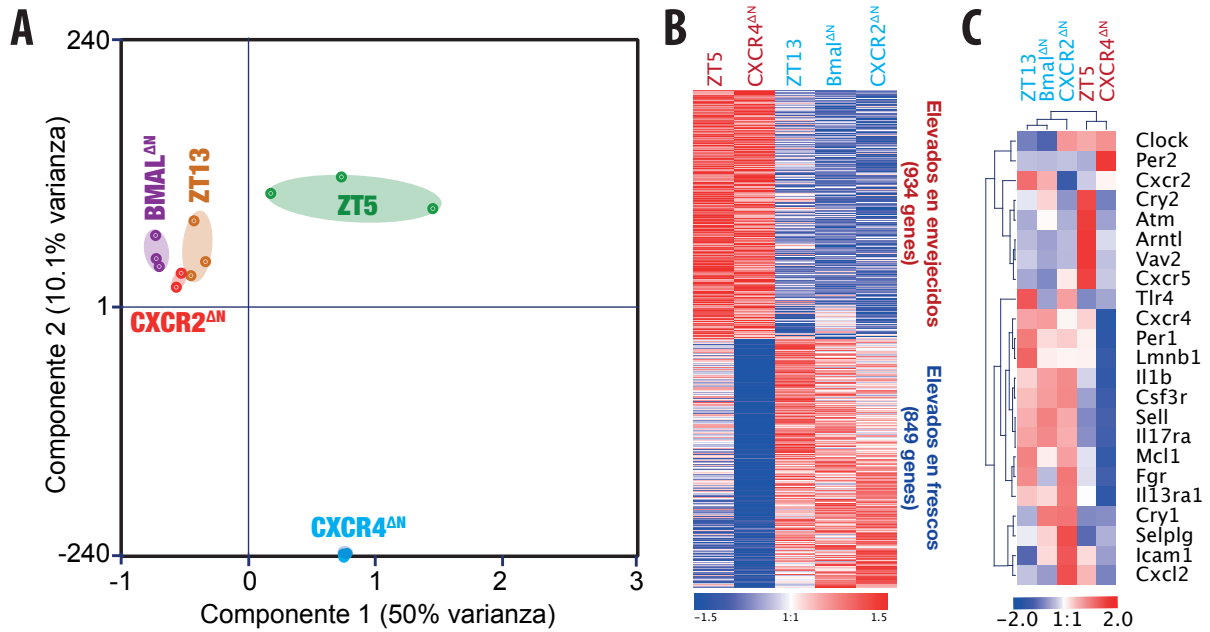
#### 4.1.4. EL ENVEJECIMIENTO ES UN PROGRAMA TRANSCRIPCIONAL GLOBAL EN NEUTRÓFILOS

Para confirmar el papel de CXCR2, CXCR4 y Bmal1, y asegurar que el fenotipo de los mutantes recapitula el de los neutrófilos WT a distintos tiempos, extrajimos ARN de todos los mutantes y realizamos secuenciación masiva para comparar los transcriptomas de los neutrófilos mutantes con los de los neutrófilos WT frescos (ZT13) y envejecidos (ZT5). De esta manera pudimos extender nuestro análisis todo el transcriptoma en lugar sólo de unos pocos marcadores de superficie.

Con todos los transcritos diferencialmente expresados realizamos un análisis de reducción dimensional (análisis de componentes principales o PCA) para comprobar el agrupamiento de los distintos tiempos y mutantes (**Figura 20A**). Todas las muestras de aquellos mutantes y tiempos que predecían un fenotipo fresco en los neutrófilos se agruparon entre sí (ZT13, CXCR2 $\Delta N$  y Bmal1 $\Delta N$ ) y se distanciaron de los neutrófilos envejecidos (ZT5 y CXCR4 $\Delta N$ ), sobre todo en el primer componente principal, que supone un 50% de la varianza.

Con el objetivo de generar una huella transcriptómica global de los neutrófilos frescos y envejecidos, hicimos un análisis de agrupamiento utilizando el método k-medias (*k-means*) de todos los genes diferencialmente expresados en los neutrófilos frescos (ZT13, CXCR2 $\Delta N$  y Bmal1 $\Delta N$ ) y envejecidos (ZT5 y CXCR4 $\Delta N$ ). Encontramos 934 genes coherentemente elevados en los neutrófilos envejecidos y 849 en los neutrófilos frescos (**Figura 20B**). Para una lista completa, véase el anexo 2.

Por último, realizamos un análisis de agrupamiento jerárquico con los genes seleccionados previamente en los neutrófilos WT a dos tiempos (ZT5 y ZT13, **Figura 13B**), y comprobamos que también con esta lista de genes los neutrófilos frescos y envejecidos se agrupaban entre sí (**Figura 20C**).

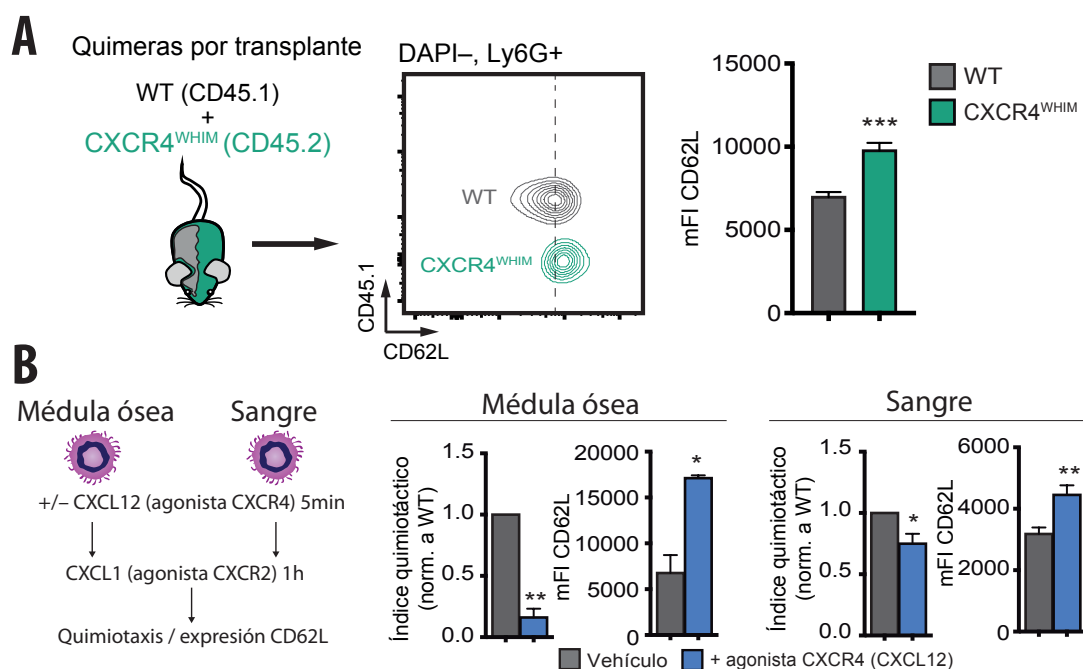


**Figura 20: RNAseq y análisis multidimensional comparativo de neutrófilos WT frescos (ZT13) y envejecidos (ZT5) con los mutantes. A)** Análisis de componentes principales (PCA) de los transcritos diferencialmente expresados. **B)** Huella transcrip-tómica común entre los grupos de neutrófilos frescos (ZT13, Bmal1<sup>ΔN</sup>, CXCR2<sup>ΔN</sup>) y envejecidos (ZT5, CXCR4<sup>ΔN</sup>). **C)** Análisis de agrupamiento jerárquico de los genes de la **Figura 13B**.

#### 4.1.5. CXCR4 ANTAGONIZA EL ENVEJECIMIENTO DE NEUTRÓFILOS

Estos datos nuevamente sugieren que CXCR2 y Bmal1 promueven el envejecimiento de los neutrófilos, mientras que CXCR4 lo inhibe. Para evitar posibles efectos colaterales de la ausencia de actividad de CXCR4, y para corroborar de manera adicional nuestra hipótesis, generamos animales quimera por trasplante de médula ósea de células WT y CXCR4<sup>WHIM</sup>, un mutante hiperseñalizador del receptor CXCR4 (Balabanian et al. 2012). Si CXCR4 inhibe el proceso de envejecimiento como indican nuestros análisis de pérdida de función con los animales CXCR4<sup>ΔN</sup> (Figura 18), predijimos que el mutante de ganancia de función CXCR4<sup>WHIM</sup> debería mostrar niveles más elevados de CD62L que los neutrófilos WT. Esto fue lo que observamos en nuestros análisis por citometría (Figura 21A).

Adicionalmente, para acumular evidencias del papel de CXCR4 en el proceso de envejecimiento, decidimos reproducir los experimentos ya publicados de inhibición de migración hacia CXCL1 (agonista CXCR2) con un pretratamiento con CXCL12 (agonista CXCR4) en los neutrófilos de médula ósea (Martin et al. 2003). Medimos la migración con neutrófilos de médula ósea y de sangre, y analizamos tanto la transmigración como los niveles de CD62L de las células transmigradas. Nuestra hipótesis era que el pretratamiento con CXCL12 debería reducir la transmigración de los neutrófilos de médula ósea y de sangre, y en ambos debería prevenir la pérdida de CD62L, al inhibir la señalización por CXCR2 y por tanto el proceso de envejecimiento. Observamos que tanto en médula ósea como en sangre, la señalización a través de CXCR4 reducía eficientemente la migración inducida vía CXCR2, y frenaba la reducción de CD62L (Figura 21B).



**Figura 21: Regulación del envejecimiento de los neutrófilos por CXCR4.** **A)** Analizamos los niveles de CD62L en animales quimera de WT y un mutante hiper-señalizador de CXCR4 (CXCR4<sup>WHIM</sup>). N=5. **B)** Análisis de quimiotaxis hacia CXCL1 y de niveles de CD62L en neutrófilos WT de médula ósea y sangre. N=2 para médula, n=5 para sangre. Estadística: test t de Student pareado (A) o no pareado (B). \*, p<0.05; \*\*, p<0.01; \*\*\*, p<0.001.

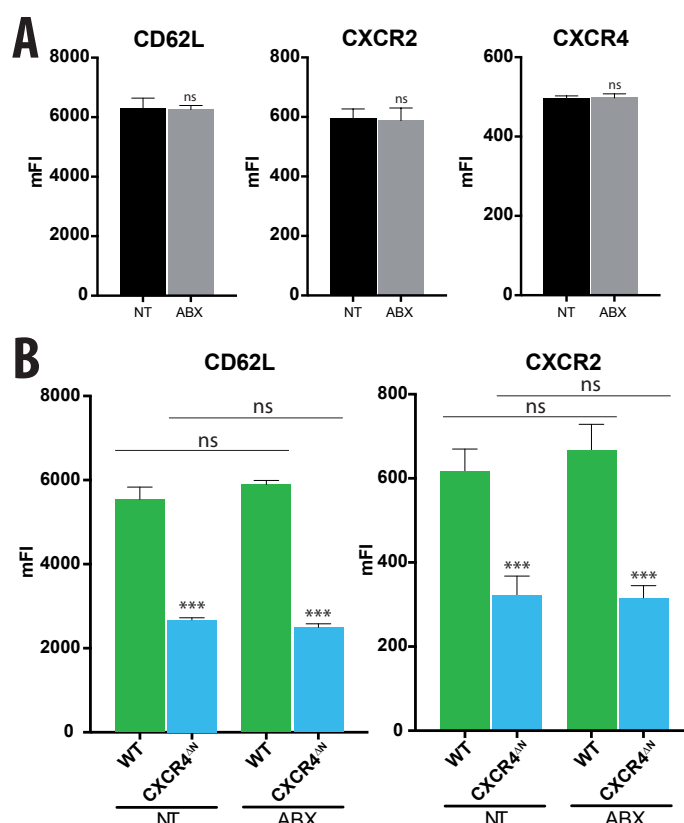
Nuestros datos demuestran, por tanto, que el proceso de envejecimiento de los neutrófilos está inducido por el reloj molecular y la señalización a través de CXCR2, y opuesto por la señalización a través de CXCR4.

#### 4.1.6. EL ENVEJECIMIENTO DE NEUTRÓFILOS ES INDEPENDIENTE DEL MICROBIOMA

Un estudio reciente, sin embargo, propuso que el envejecimiento de los neutrófilos está regulado por señales extrínsecas inducidas vía receptores TLR por agonsistas producidos por la microbiota (Zhang et al. 2015). Para tratar de reproducir estos resultados y analizar su implicación en nuestro modelo de envejecimiento intrínseco utilizamos un protocolo idéntico al descrito en ese trabajo para la eliminación de microbiota mediante tratamiento con un cóctel de antibióticos. Hipotetizamos que si las señales desde la microbiota fueran responsables del proceso de envejecimiento, encontraríamos un fenotipo más fresco en los animales WT tratados con antibióticos. Por otro lado, si nuestro proceso de envejecimiento fuera independiente de microbiota, los neutrófilos de quimeras WT y CXCR4<sup>ΔN</sup> mantendrían diferente perfil de envejecimiento incluso en ausencia de microbiota, pero si fuera dependiente de ella estas diferencias deberían desaparecer.



Con esta hipótesis de partida, analizamos el estado de envejecimiento de animales WT tratados (grupo ABX) o sin tratar. Nuestros datos demostraron un fenotipo idéntico en animales tratados o no con antibióticos (**Figura 22A**). Análogamente, al analizar el efecto del tratamiento sobre las quimeras WT: CXCR4<sup>ΔN</sup> no observamos corrección de las diferencias entre genotipos (**Figura 22B**), lo que indica que el proceso de envejecimiento es independiente de microbiota.



**Figura 22: La depleción de microbiota intestinal no afecta al envejecimiento de los neutrófilos. A)** Análisis citométrico del efecto del tratamiento con antibióticos (ABX) sobre tres marcadores de envejecimiento. No observamos ninguna diferencia entre los grupos. N=9-10 por tratamiento. **B)** Comparación del estado de envejecimiento de neutrófilos WT y CXCR4<sup>ΔN</sup> en quimeras tratadas con antibióticos o sin tratar. Las diferencias entre los neutrófilos WT y CXCR4<sup>ΔN</sup> se mantienen con el tratamiento. N=5 por tratamiento. Estadística: test T de Student no pareado (A-B) o pareado (B, entre el mutante y su control WT interno, asteriscos). \*\*\*, p<0.001; ns, no significativo.

#### 4.1.7. EL ENVEJECIMIENTO DE NEUTRÓFILOS NO REQUIERE PRODUCCION DE ROS

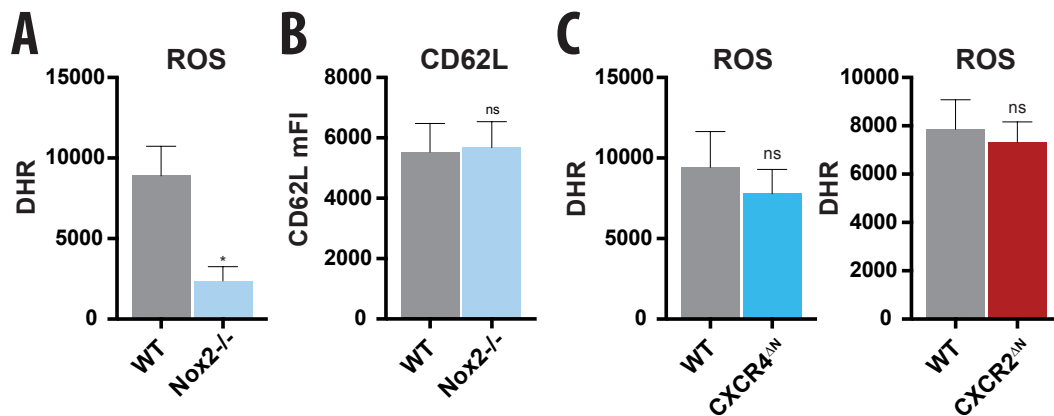
Por otro lado, dado que hemos definido que el proceso de envejecimiento depende de la señalización a través de CXCR2, y que ésta se ha descrito asociada a procesos de senescencia celular dependientes de especies reactivas de oxígeno (ROS), decidimos analizar el posible papel de la producción de ROS en el proceso de envejecimiento. Para ello prepara-

mos animales quiméricos por trasplante de médula ósea WT y Nox2<sup>-/-</sup>; estos mutantes son deficientes en gp91, la principal proteína de la NADPH-oxidasa del neutrófilo, requerida para producir ROS.

Analizamos en primer lugar la producción de ROS por citometría de flujo usando DHR. Observamos, como era de esperar, una marcada reducción de la producción de ROS *in vitro* (**Figura 23A**, izquierda) en las células Nox2<sup>-/-</sup> en respuesta a PMA, un potente inductor de ROS (12-miristato 13-acetato de forbol). Sin embargo, no observamos cambios en los niveles de CD62L comparado los neutrófilos Nox2<sup>-/-</sup> con controles WT (**Figura 23A**, derecha), lo que indica que la NADPH-oxidasa no está implicada en el proceso de envejecimiento del neutrófilo.

Por otro lado, se ha descrito que los neutrófilos envejecidos producen más especies reactivas de oxígeno (Zhang et al. 2015); sin embargo, no encontramos diferencias en la producción de ROS en neutrófilos procedentes de quimeras de médula ósea WT:CXCR4<sup>ΔN</sup> o WT:CXCR2<sup>ΔN</sup> (**Figura 23B**).

Una de las diferencias fundamentales en los análisis publicados y los que aquí presentamos es el agente inductor de la producción de ROS, que fue LPS en el caso del citado artículo y PMA en nuestro caso. PMA es un inductor de la producción de ROS más potente que el LPS, lo que quizá impida reproducir las diferencias en nuestro análisis. Alternativamente, la mayor producción de ROS en los neutrófilos envejecidos puede ser dependiente del estímulo.

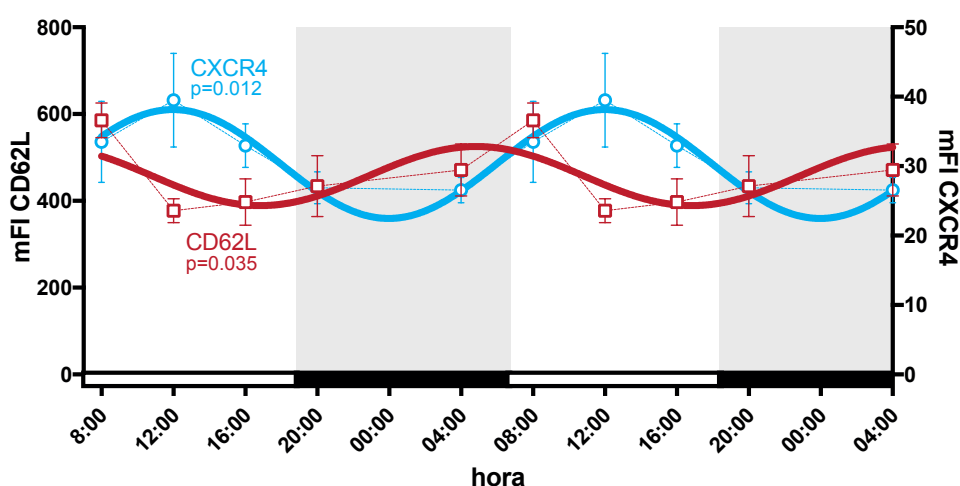


**Figura 23: La producción de ROS por la NADHP-oxidasa no está implicada en el proceso de envejecimiento.** **A)** Análisis citométrico de la producción de ROS como respuesta a estimulación con PMA en animales quiméricos WT:Nox2<sup>-/-</sup>. N=4. **B)** Análisis citométrico de los niveles basales de CD62L en animales quiméricos WT:Nox2<sup>-/-</sup>. N=19. **C)** Producción de ROS como respuesta a estimulación con PMA en quimeras WT:CXCR2<sup>ΔN</sup> y WT:CXCR4<sup>ΔN</sup>. N=3-5 por grupo. Estadística: test t de Student pareado. \*, p<0.05; ns, no significativo.

En cualquier caso, estos análisis nos permiten concluir que el proceso de envejecimiento es independiente de la producción de ROS por la NADPH-oxidasa, y que la capacidad de producir ROS no cambia significativamente durante este proceso.

### 4.1.8. ENVEJECIMIENTO DE NEUTRÓFILOS EN HUMANOS

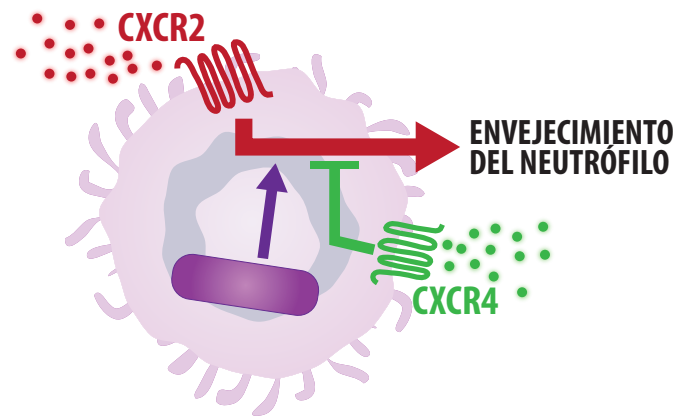
Este proceso de envejecimiento se ha descrito hasta ahora en ratones, pero no hay evidencias de que ocurra también en humanos. Para comprobar si en humanos los neutrófilos en circulación siguen ritmos temporales similares, analizamos los niveles de CD62L y CXCR4 en neutrófilos de muestras de sangre extraídas a distintas horas del día de voluntarios sanos procedentes de un ensayo clínico del Hospital de la Princesa. Comprobamos que la fluctuación del fenotipo de los neutrófilos en humanos (**Figura 24**) sigue el mismo patrón que en ratones (**Figura 14A**), lo que apunta a que el proceso de envejecimiento de los neutrófilos ocurre también en humanos. De la misma manera que en ratones, los neutrófilos humanos mostraban un fenotipo envejecido durante el día y fresco durante la noche.



**Figura 24: Fluctuación circadiana de marcadores de envejecimiento de los neutrófilos en humanos.** Los niveles de CD62L y CXCR4 en neutrófilos se midieron en voluntarios sanos a distintas horas del día. N=6. Estadística: test de amplitud contra cero.

En conclusión, proponemos un modelo consistente con todos los datos anteriores en el que el reloj molecular y la señalización por CXCR2 promueven, mientras que la señalización a través de CXCR4 frena (**Figura 18**), el envejecimiento de los neutrófilos (**Figura 25**). Definimos que éste es un programa transcripcional global (**Figura 13**, **Figura 20**), y demostramos que CXCR4 frena el proceso inhibiendo la señalización por CXCR2 (**Figura 14**, **Figura 21**).

Los niveles en plasma de CXCL1, un ligando de CXCR2 fluctúan en paralelo con el fenotipo envejecido y proveerían una señalización basal de envejecimiento. Los niveles de CXCL12, en cambio, presentan marcadas fluctuaciones a lo largo del día, con un pico durante la noche que coincide con el pico del fenotipo fresco (**Figura 15**).

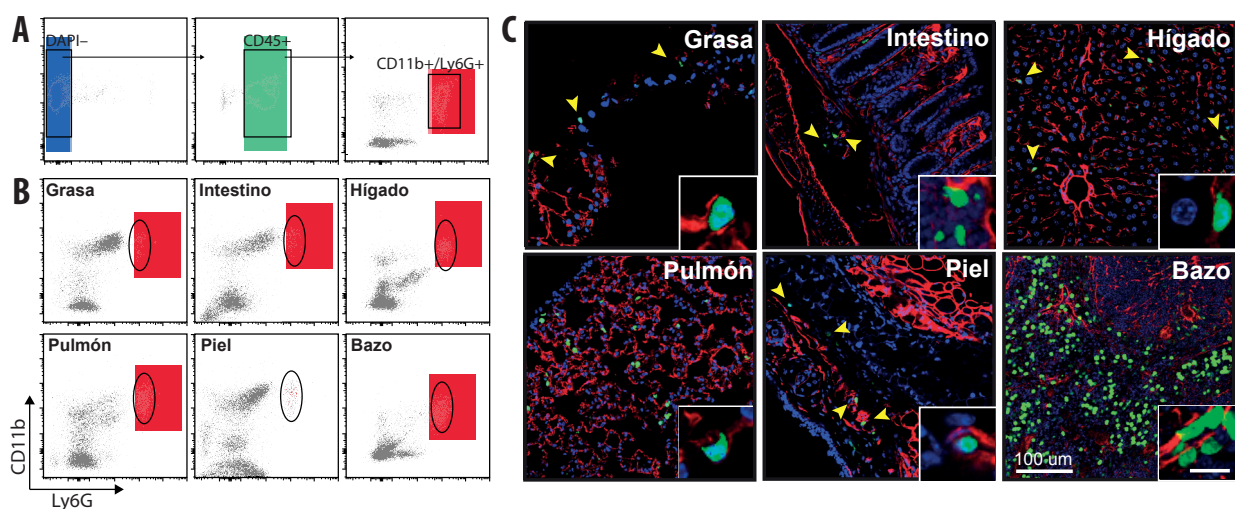


**Figura 25: Modelo propuesto de la regulación del proceso de envejecimiento en los neutrófilos.** El envejecimiento es un proceso por defecto en los neutrófilos, impulsado por el reloj molecular y la señalización a través de CXCR2. A este proceso se opone la señalización a través de CXCR4.

## 4.2. Envejecimiento del neutrófilo y eliminación homeostática de la circulación

**H**abiendo demostrado que el proceso de envejecimiento de los neutrófilos es un programa transcripcional controlado por Bmal1, CXCR2 y CXCR4, y que nuestros mutantes neutrófilo-específicos recapitulan el fenotipo de envejecimiento, nos preguntamos a continuación si éste proceso de envejecimiento es un requisito previo para la salida homeostática espontánea de los neutrófilos (o *clearance*) de circulación.

En primer lugar, para determinar la salida espontánea y presencia de neutrófilos en tejidos usamos citometría de flujo y también microscopía confocal de cortes finos de tejidos procedentes de animales reporteros WT-LysMGFP, que expresan eGFP en el linaje mieloide (Faust et al. 2000), con máxima intensidad en neutrófilos. Para marcar los neutrófilos en tejidos para citometría utilizamos la estrategia mostrada en la **Figura 26A** (singletes/DAPI-/CD45+/CD11b+Ly6G+). Encontramos una población de neutrófilos en todos los tejidos analizados, tanto por citometría (**Figura 26B**) como por microscopía (**Figura 26C**). Estos experimentos demuestran la continua salida de neutrófilos de sangre a tejidos en condiciones basales.



**Figura 26: Salida espontánea de neutrófilos a los tejidos (*clearance*).** A) Estrategia de citometría para marcar los neutrófilos en tejido. Gráficos representativos de una



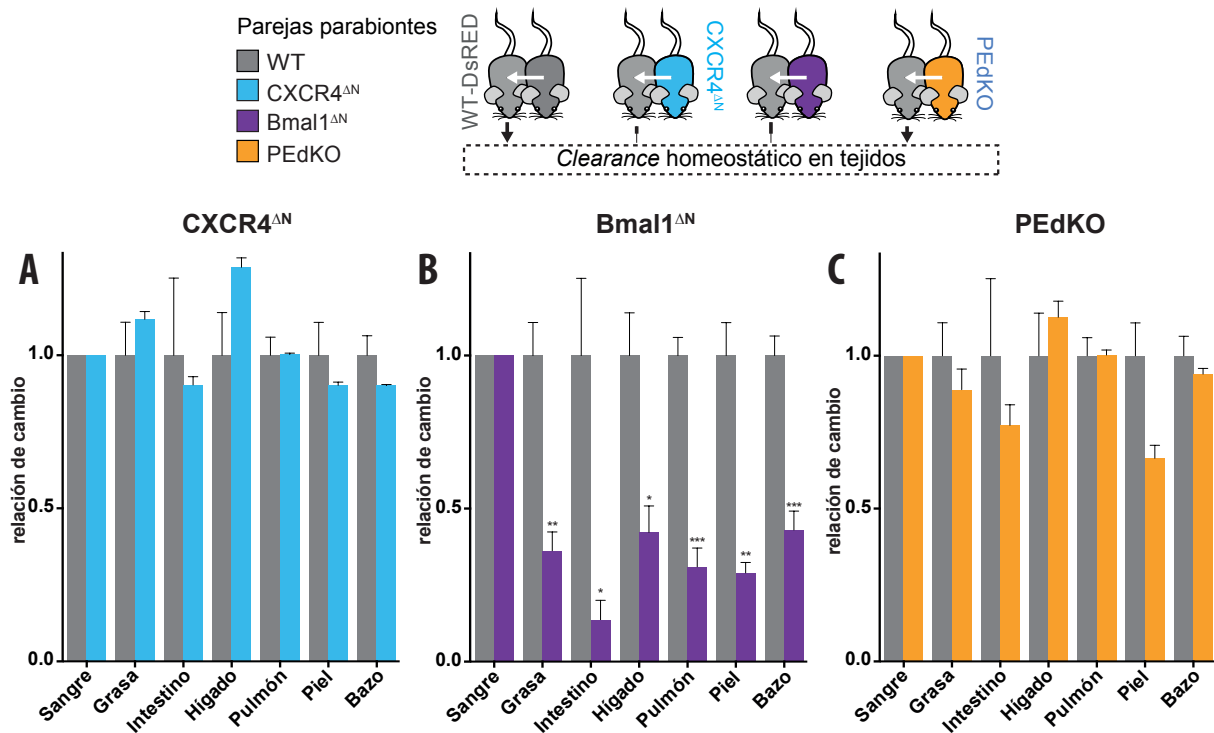
muestra de sangre. B) Gráficos representativos de la población de neutrófilos (marcada en rojo) en los tejidos analizados en la **Figura 27**. C) Imágenes de microscopía de animales reporteros WT-LysMGFP que muestran neutrófilos (en verde, punta de flecha) en los tejidos analizados en la **Figura 27**. Escala 100µm. Escala del inserto: 10µm. Marcaje: eGFP (verde), laminina (rojo) y DAPI (azul).

A continuación utilizamos los ratones mutantes para analizar el *clearance* homeostático de neutrófilos frescos y envejecidos. Aunque el proceso de envejecimiento se definió originalmente por anteceder al periodo de *clearance* (Casanova-Acebes et al. 2013), no hay evidencias causales que relacionen ambos fenómenos. Para poder distinguir entre neutrófilos producidos en el tejido de aquellos provenientes de la circulación, utilizamos el modelo de parabiosis, que permite unir la circulación de dos animales experimentales de modo que las células circulantes (incluidos los neutrófilos) se comparten entre los dos miembros de la pareja.

Generamos parejas de parabiontes entre animales WT-DsRED y mutantes Bmal1<sup>ΔN</sup> (con neutrófilos frescos) y CXCR4<sup>ΔN</sup> (con neutrófilos envejecidos). También generamos parejas WT-DsRED:WT como controles de migración. Esto nos permitió analizar en los tejidos del animal WT la migración homeostática de neutrófilos WT y mutantes de manera simultánea y en el mismo ambiente. Adicionalmente, el uso de los mutantes nos permite excluir factores extrínsecos a la célula que puedan estar influenciados por el tiempo, como cambios en moléculas de adhesión endoteliales (Scheierrmann et al. 2012). Al comparar la proporción de neutrófilos de cada miembro de la pareja en los tejidos del parabionte WT con la proporción que muestran en sangre podemos estimar su eficiencia de *clearance* fuera de circulación (véase sección de métodos). Hipotetizamos que si el proceso de envejecimiento es necesario para la eliminación circadiana homeostática de los neutrófilos hacia los tejidos, la migración de los neutrófilos Bmal1<sup>ΔN</sup> sería menor que la de sus compañeros WT, y menor también que la de los CXCR4<sup>ΔN</sup>.

Observamos que el *clearance* de neutrófilos Bmal1<sup>ΔN</sup> (**Figura 27B**) a múltiples tejidos de sus parejas WT estaba fuertemente disminuido, mientras que no se veía afectado, o incluso mostraba alguna tendencia a elevarse en neutrófilos CXCR4<sup>ΔN</sup> (**Figura 27A**). Para corroborar este punto utilizamos un modelo independiente de neutrófilos envejecidos en ratones PEdKO (Casanova-Acebes et al. 2013). En las parejas WT:PEdKO pudimos corroborar que, de nuevo, los neutrófilos envejecidos no muestran problemas en la salida homeostática a tejidos (**Figura 27C**).

En resumen, puesto que la salida homeostática de la circulación hacia los tejidos de neutrófilos frescos (Bmal1<sup>ΔN</sup>) está fuertemente reducida respecto a la de los neutrófilos envejecidos (CXCR4<sup>ΔN</sup> y PEdKO), concluimos que el proceso de envejecimiento de los neutrófilos es un pre-requisito para la eliminación eficiente de la circulación y consecuente entrada a los tejidos.



**Figura 27: Eliminación homeostática circadiana de neutrófilos en tejido.** En parejas de parabiontes WT:WT (en gris en todos los casos), WT:CXCR4<sup>ΔN</sup> (A), WT:Bmal1<sup>ΔN</sup> (B) y WT:PEdKO (C) se analizó la relación de cambio entre la proporción de neutrófilos en tejido comparada con la de sangre, para estimar la capacidad de infiltración homeostática en los tejidos de neutrófilos frescos (B) y envejecidos (A y C). N=3-8. Estadística: test t de Student no pareado. \*, p<0.05; \*\*, p<0.01; \*\*\*, p<0.001.

### 4.3. Consecuencias del envejecimiento de los neutrófilos

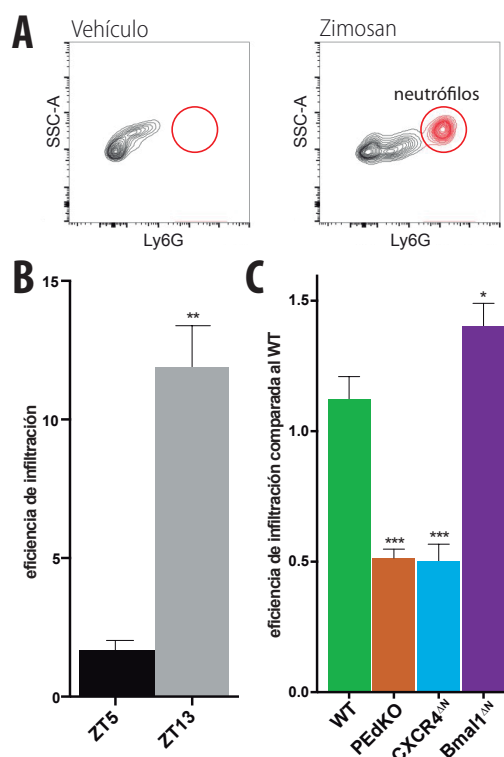
**A** continuación investigamos las consecuencias del proceso de envejecimiento de los neutrófilos en su capacidad de respuesta inflamatoria. Para ello utilizamos animales quiméricos por trasplante de médula ósea en un modelo de peritonitis estéril por inyección intraperitoneal de zimosan, un glucano de la pared de los hongos (Cash et al. 2009).

El modelo de peritonitis es especialmente relevante porque el peritoneo es un compartimento carente de neutrófilos en condiciones basales, de modo que permite analizar la eficiencia de infiltración diferencial de los neutrófilos frescos y envejecidos (**Figura 28A**).

Comenzamos preguntándonos si la infiltración al peritoneo tiene un comportamiento circadiano en animales WT a ZT5 y ZT13. Observamos que la eficiencia de infiltración al peritoneo en relación al número de neutrófilos en sangre es más de 5 veces superior a ZT13 que a ZT5, sugiriendo que los neutrófilos frescos tienen mayor capacidad de infiltrar tejidos inflamados (**Figura 28B**).

Para confirmar si la diferencia de comportamiento se debe a factores neutrófilo-específicos, es decir, al estado de envejecimiento de las células a ZT5 y ZT13, o bien a factores extrínsecos, utilizamos las quimeras WT:WT como control, WT:Bmal1<sup>ΔN</sup>, y WT:CXCR4<sup>ΔN</sup>; y los parabiontes WT:PEdKO como segundo modelo de neutrófilos envejecidos. El uso de quimeras o parabiontes permite analizar el comportamiento de ambos tipos de neutrófilos en el mismo endotelio y las mismas condiciones fisiológicas. Estos experimentos indicaron que los neutrófilos frescos Bmal1<sup>ΔN</sup> tienen mayor eficiencia de infiltración, y que los neutrófilos envejecidos (CXCR4<sup>ΔN</sup> y PEdKO) muestran menor capacidad de infiltración, comparados con células control WT (**Figura 28C**).

En conjunto, estos resultados indican que los neutrófilos pierden capacidad de infiltrar tejidos inflamados según envejecen, y que este proceso es intrínseco a la células.



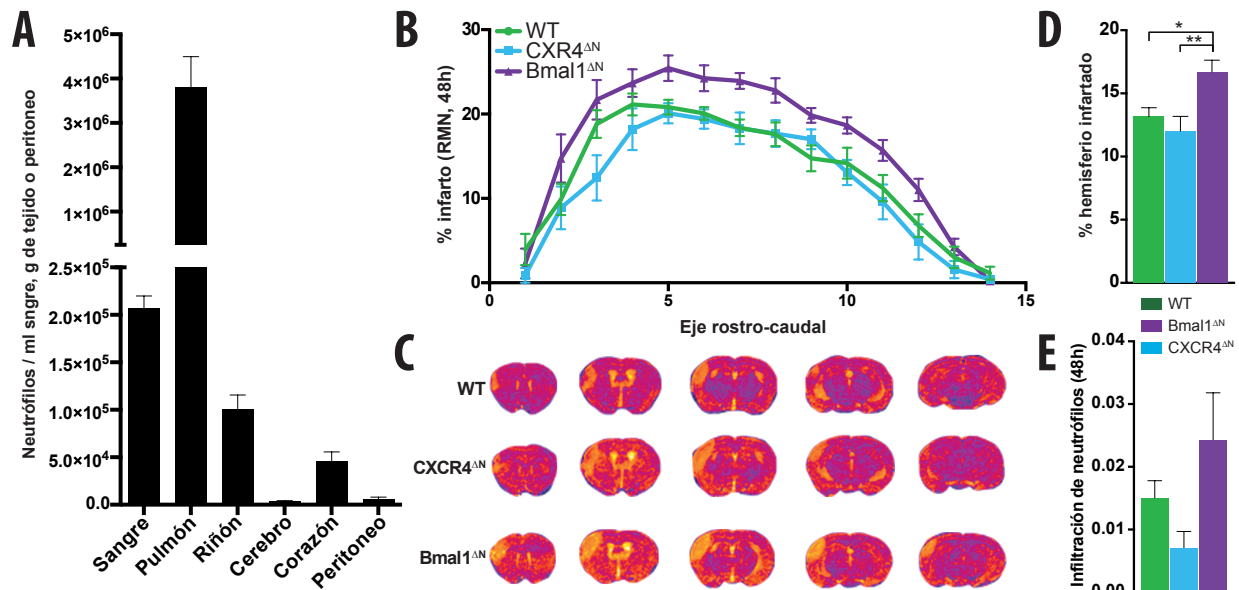
**Figura 28: Migración de neutrófilos frescos y envejecidos al peritoneo inflamado.**

**A)** Gráficos citométricos representativos de neutrófilos en el peritoneo tras tratar con vehículo o zimosan. La región marcada indica neutrófilos. **B)** Eficacia de infiltración al peritoneo de neutrófilos WT a ZT5 (envejecidos) y ZT13 (frescos). N=3. **C)** Eficacia de infiltración de neutrófilos en quimeras WT:Bmal1<sup>ΔN</sup>, WT:CXCR4<sup>ΔN</sup> y WT:WT; y en parabiontes WT:PEdKO. N=3-5. Estadística: test t de Student no pareado entre los dos grupos (B) y pareado entre la eficiencia de cada mutante con su control interno WT (C). \*, p<0.05; \*\*, p<0.01; \*\*\*, p<0.001.

#### 4.3.1. CONTRIBUCIÓN DE NEUTRÓFILOS FRESCOS Y ENVEJECIDOS EN INFLAMACIÓN ESTÉRIL

Para corroborar estos resultados, decidimos analizar la contribución de los neutrófilos frescos y envejecidos en un proceso inflamatorio no infeccioso. Elegimos un modelo de isquemia cerebral inducida mediante ligación permanente de la arteria cerebral media (ictus). Este modelo es particularmente relevante porque el cerebro, como el peritoneo, es un órgano desprovisto de neutrófilos en estado basal (**Figura 29A**), de modo que el volumen de infarto depende directamente de la capacidad de infiltración de los neutrófilos. Al analizar por resonancia magnética el volumen de infarto cerebral 48h después de la ligación (**Figura 29C**), observamos que éste era mayor en los animales con neutrófilos frescos (Bmal1<sup>ΔN</sup>), tanto en los distintos cortes rostro-caudales (**Figura 29B**) como en el porcentaje general de hemisferio infartado (**Figura 29D**). Por el contrario, no encontramos diferencias en animales CXCR4<sup>ΔN</sup> comparados con controles WT. Esto correlacionó con el número de neutrófilos infiltrantes en el cerebro dañado, recapituló los resultados observados en el caso

de la peritonitis (**Figura 29E**), y demostró una función predominante de neutrófilos frescos durante procesos inflamatorios estériles.



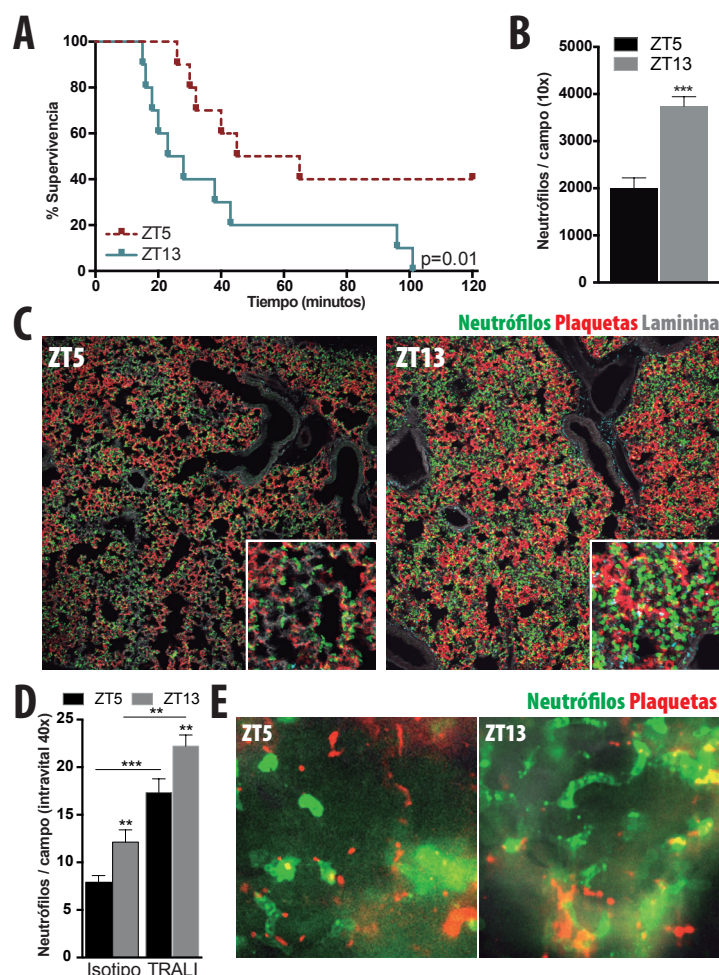
**Figura 29: Efecto de los neutrófilos frescos y envejecidos en el infarto cerebral.** **A)** Número de neutrófilos extravasados en distintos tejidos de animales WT por citometría de flujo. N=5. **B)** Porcentaje rostro-caudal de infarto inducido a ZT5 en los distintos mutantes, a partir de las imágenes de resonancia magnética mostradas en **C**. **D)** Cuantificación del porcentaje de hemisferio infartado en animales WT, Bmal1<sup>ΔN</sup> y CXCR4<sup>ΔN</sup>. **E)** Eficiencia de infiltración de neutrófilos en el cerebro 48h después del infarto. N=8-11 ratones por grupo. Estadística: ANOVA de una vía. \*, p<0.05; \*\*, p<0.01.

Para determinar si la contribución diferencial de neutrófilos frescos y envejecidos aplica universalmente a procesos inflamatorios estériles, usamos también un modelo de daño pulmonar agudo relacionado con transfusión (TRALI, de *transfusion-related acute lung injury* (Looney et al. 2009)). TRALI es la principal causa de mortalidad por transfusión a nivel mundial, y los neutrófilos son el tipo celular clave en la patogénesis (Fung & Silliman 2009). Este modelo experimental se induce con una combinación de endotoxina y anticuerpo anti-MHC de clase I, y requiere un fondo genético BALB/C. Por este motivo evaluamos el impacto en daño pulmonar a ZT5 y a ZT13, los tiempos que coinciden con el pico y el valle, respectivamente, de neutrófilos envejecidos en sangre.

Primero comparamos la supervivencia al daño pulmonar agudo a los dos tiempos, y observamos una mortalidad significativamente mayor cuando el daño se induce a ZT13 (**Figura 30A**). Esto podría sugerir que los neutrófilos frescos, con su mayor capacidad de infiltración, agravan el daño por TRALI. Para verificarlo realizamos inmunotinciones de pulmones sometidos a TRALI y recogidos 15 minutos tras la inducción, momento en que aún no ha comenzado la mortalidad, y cuantificamos el número de neutrófilos por campo. Observamos un incremento muy significativo del número de neutrófilos infiltrados en el pulmón a ZT13, que correlaciona con la mayor mortalidad (**Figura 30B-C**). También fueron mayores los acúmulos de plaquetas (en rojo en las imágenes), cuyo papel es clave para el desencadenamiento de la enfermedad, como hemos demostrado recientemente (Sreeramkumar et al. 2014; Hidalgo et al. 2009). Finalmente, decidimos analizar el



comportamiento de los neutrófilos en TRALI por microscopía intravital de pulmón, y de nuevo observamos que a ZT13 el número de neutrófilos retenidos en el pulmón es mayor, tanto sin inducción de TRALI como con inducción (**Figura 30D-E**).



**Figura 30: El daño pulmonar agudo se exagera a ZT13.** **A)** Curva de supervivencia de ratones WT sometidos a TRALI a ZT5 o ZT13. N=10 animales por punto. **B)** Cuantificación del número de neutrófilos por campo en inmunotinciones por microscopía confocal. N=17-18 campos de 3 animales. **C)** Imágenes representativas de microscopía confocal cuantificadas en (B). **D)** Cuantificación de la infiltración de neutrófilos en pulmones a ZT5 y ZT13 en animales sin inducción de TRALI (isotipo) o tras inyección del anticuerpo anti-MHC de clase I (TRALI). N=15-36 campos (isotipo) y 77-100 campos de 5-6 animales (TRALI). **E)** Imágenes representativas de microscopía intravital de pulmón de animales en los que se ha inducido TRALI a ZT5 o ZT13. Estadística: test t de Student. \*,  $p<0.05$ ; \*\*,  $p<0.01$ ; \*\*\*,  $p<0.001$ .

El papel definitivo de neutrófilos frescos y envejecidos en este modelo se confirmará en los mutantes  $Bmal1^{\Delta N}$  y  $CXCR4^{\Delta N}$ , que están actualmente en retrocruzamiento hacia el fondo permisivo BALB/C. No obstante, los datos apuntan hacia un papel más activo de los neutrófilos frescos en la patogénesis del daño pulmonar agudo. El daño se ve agravado cuanto mayor es la infiltración de neutrófilos al pulmón, con lo que la mayor capacidad de infiltración de los neutrófilos frescos podría ser clave. Alternativamente, es posible que la presencia de neutrófilos envejecidos, que infiltran preferentemente a ZT13 explique

nuestras observaciones (**Figura 30D**, isotipo). Podrían ser esos neutrófilos envejecidos acumulados en el pulmón los que desencadenaran la respuesta responsable de la mayor mortalidad a ZT13. En cualquiera de los dos casos, no obstante, es probable que el proceso de envejecimiento de los neutrófilos juegue un papel determinante en la patogénesis del daño pulmonar agudo.

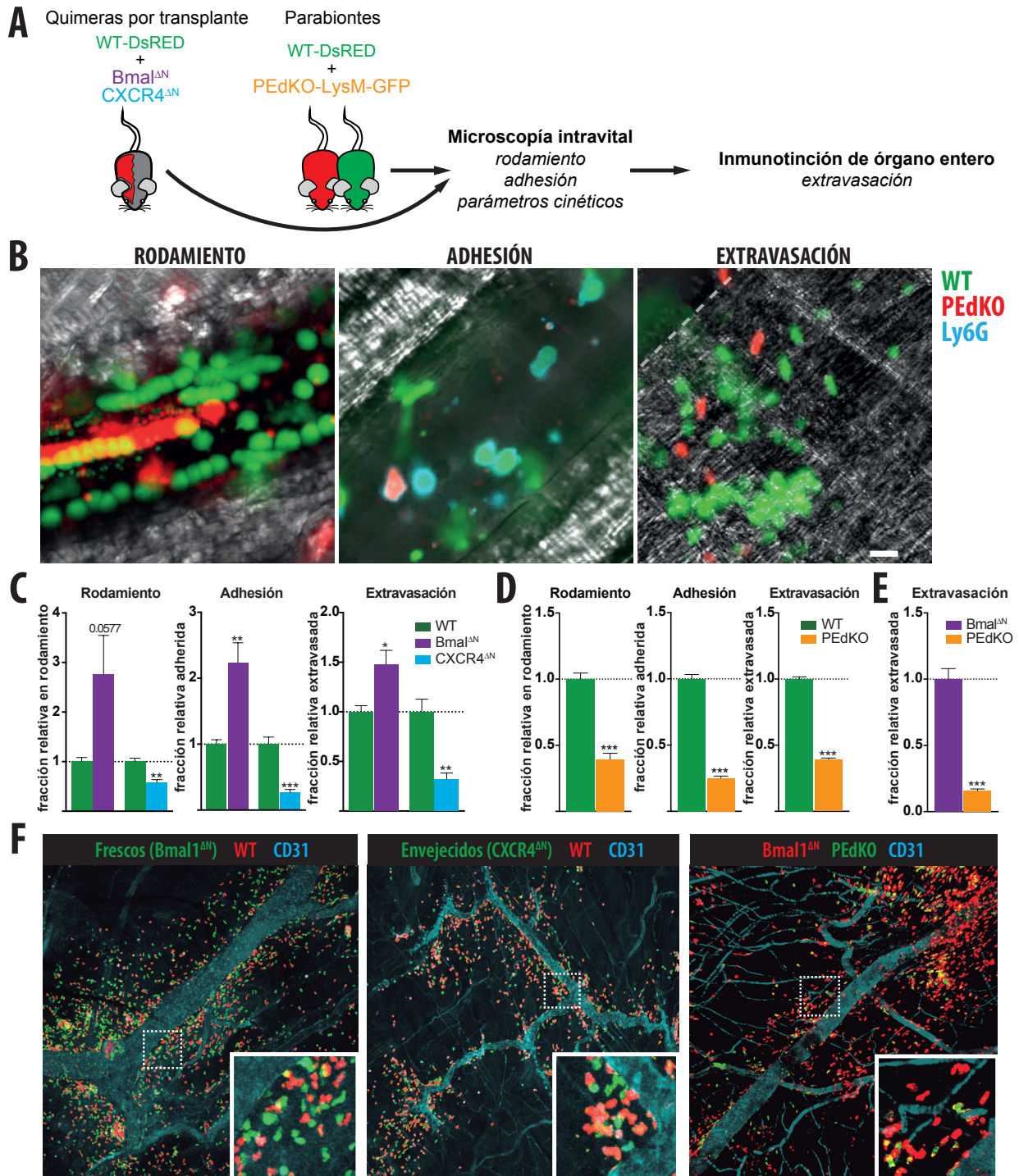
### 4.3.2. ALTERACIONES DE RODAMIENTO Y RECLUTAMIENTO EN NEUTRÓFILOS ENVEJECIDOS

Puesto que la diferencia principal que observamos en todos los modelos (zimosan, ictus y TRALI) es la capacidad de infiltración, decidimos analizar con más detalle este proceso utilizando microscopía intravital. Para ello generamos animales quiméricos por trasplante de médula ósea de donantes WT y los distintos mutantes, y realizamos microscopía intravital del musculo cremaster inflamado por tratamiento con TNF $\alpha$ . Esto permitió el análisis de los tres pasos principales del proceso de infiltración: rodamiento (*rolling*) de los neutrófilos sobre el endotelio vascular, adhesión firme y extravasación.

Analizamos también tres parámetros cinéticos de los neutrófilos adheridos sobre el endotelio vascular y en el espacio extravascular: velocidad, distancia acumulada y direccionalidad. Tras el análisis por microscopía intravital extrajimos el músculo cremaster y preparamos inmuntinciones de órgano entero (*whole mount*) para cuantificar con exactitud la proporción de neutrófilos WT y mutantes extravasados en el tejido. Para confirmar los resultados, analizamos de la misma manera parabiontes entre animales WT y PEdKO (**Figura 31A**).

Nuestros análisis de microscopía intravital (**Figura 31B**, y **vídeo suplementario 1**) demostraron que la eficiencia de rodamiento era mayor en los neutrófilos constitutivamente frescos (Bmal1 $^{\Delta N}$ ) y estaba reducida en los constitutivamente envejecidos (CXCR4 $^{\Delta N}$ ). Igualmente, las eficiencias de adhesión y de extravasación eran mayores en las células Bmal1 $^{\Delta N}$  y estaban reducidas en células CXCR4 $^{\Delta N}$  (**Figura 31C** y **Figura 31F**). Pudimos confirmar los resultados en parabiontes WT:PEdKO en los que los neutrófilos envejecidos del animal PEdKO mostraron menor eficacia de rodamiento, adhesión y extravasación sobre el endotelio del miembro WT de la pareja (**Figura 31D**). La comparación directa de células Bmal1 $^{\Delta N}$  y PEdKO en análisis de inmuntinciones de tejidos completo de parabiontes demostró claramente la mayor eficiencia de extravasación de los neutrófilos frescos (**Figura 31E-F**).

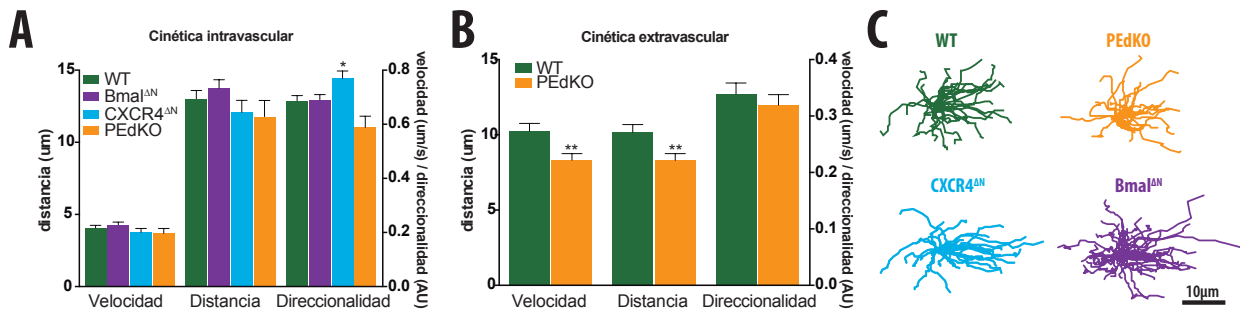
Estos datos concuerdan con la menor infiltración de neutrófilos envejecidos que observamos en el peritoneo inflamado (**Figura 28**), e indican que los neutrófilos envejecidos tienen menor capacidad de rodamiento, adhesión y extravasación que los neutrófilos frescos. Puesto que el fallo se detecta ya a nivel del rodamiento, es posible que la pérdida de eficacia en la adhesión y extravasación posteriores se deba a la menor eficacia de rodamiento, que es el primer paso de la cascada de adhesión y reclutamiento de los linfocitos (Kolaczowska & Kubes 2013).



**Figura 31: Cascada de adhesión y extravasación en neutrófilos frescos y envejecidos.** **A)** Esquema experimental. **B)** Imágenes representativas de microscopía intravital de las fases de rodamiento (kinograma), adhesión y extravasación. **C)** Eficiencia de rodamiento, adhesión y extravasación de neutrófilos frescos (Bmal<sup>ΔN</sup>) y envejecidos (CXCR4<sup>ΔN</sup>) en quimeras con células WT. N=30-61 vénulas y 20497-80811 células extravasadas de 5-6 ratones por grupo. **D)** Eficiencia de rodamiento, adhesión y extravasación de neutrófilos en parabiontes WT:PEdKO. N=28-53 vénulas y 10021 células extravasadas de 3-5 parejas de parabiontes. **E)** Eficiencia de extravasación en parabiontes Bmal<sup>ΔN</sup>:PEdKO. N=26752 células de dos parejas de parabiontes. **F)** Imágenes representativas de las inmunotinciones cuantificadas para analizar la extravasación mostrada en C-E. Estadística: test t de Student pareado. \*, p<0.05; \*\*, p<0.01; \*\*\*, p<0.001.

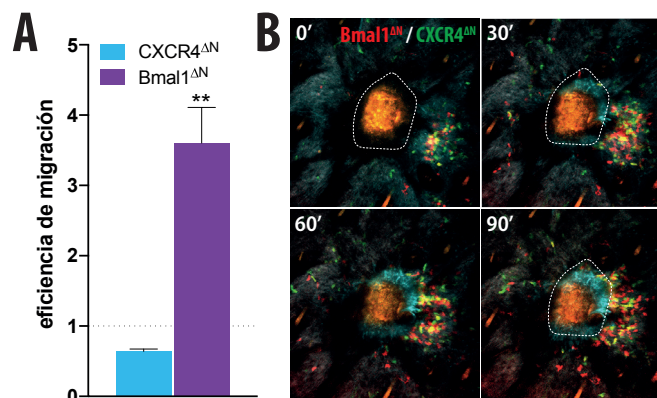


Al analizar los parámetros cinéticos de los neutrófilos una vez adheridos al endotelio vascular, durante la fase de arrastramiento (*crawling*), no encontramos grandes diferencias en velocidad, distancia o direccionalidad (**Figura 32A,C**) entre los neutrófilos frescos y envejecidos. Al analizar estos mismos parámetros en los neutrófilos extravasados de los parabiontes WT:PEdKO encontramos una ligera disminución de la velocidad y la distancia recorrida de los neutrófilos envejecidos (**Figura 32B**), sugiriendo que la capacidad de movimiento en el parénquima tisular inflamado está moderadamente afectada en esta población.



**Figura 32: Movimiento de neutrófilos frescos y envejecidos.** **A)** Parámetros cinéticos de neutrófilos WT, Bmal1<sup>ΔN</sup>, CXCR4<sup>ΔN</sup> y PEdKO sobre el endotelio vascular. N=30-61 células de 3-6 ratones por grupo. **B)** Parámetros cinéticos de neutrófilos WT y PEdKO en el espacio extravascular. N=30-33 células de 3 parejas parabiontes. **C)** Patrón de arrastramiento (*crawling*) de todos los grupos sobre el endotelio vascular, procedentes de los análisis en (A) y (B). Estadística: test t de Student pareado. \*, p<0.05; \*\*, p<0.01.

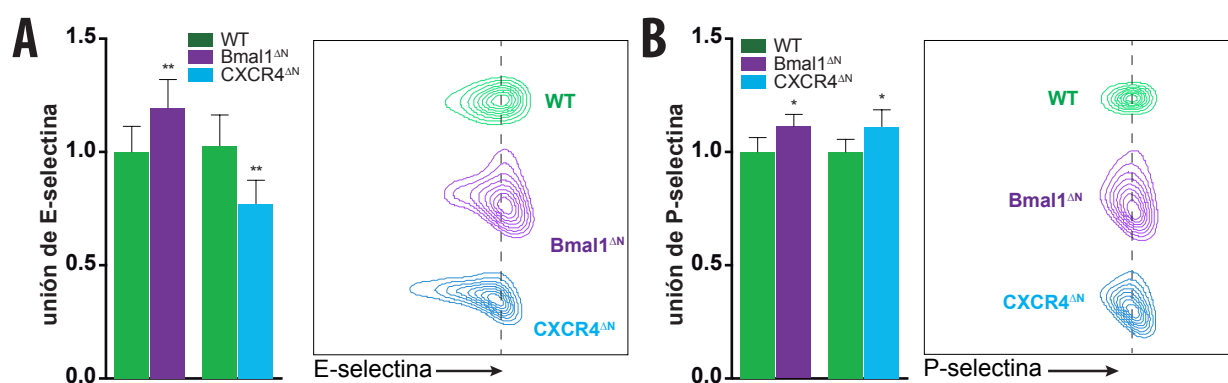
Para testar el comportamiento de neutrófilos envejecidos en otro modelo de daño tisular, usamos microscopía intravital multifotón en un modelo de necrosis inducido por láser en piel, que a diferencia de los anteriores es muy localizado y está temporalmente controlado. Análisis en animales quiméricos por trasplante de médula ósea CXCR4<sup>ΔN</sup> y Bmal1<sup>ΔN</sup> de nuevo mostraron que los neutrófilos frescos (Bmal1<sup>ΔN</sup>) migraban con mayor eficiencia a la zona de daño (**Figura 33**). Véase también el **vídeo suplementario 2**.



**Figura 33: Microscopía intravital de la respuesta de neutrófilos frescos y envejecidos al daño localizado por láser.** **A)** Eficiencia de extravasación al foco de daño respecto a la proporción en sangre de ratones quimera Bmal1<sup>ΔN</sup>:CXCR4<sup>ΔN</sup> por microscopía multifotón 4D. **B)** Imágenes representativas de la infiltración a lo largo del tiempo. El análisis citométrico de sangre de este animal mostró un 14,4% de neutrófilos Bmal1<sup>ΔN</sup> y un 85,6% de neutrófilos CXCR4<sup>ΔN</sup> en circulación. Estadística: test t de Student pareado (A). \*\*, p<0.01.

### 4.3.3. MECANISMOS DE LA DEFICIENCIA DE RODAMIENTO DE NEUTRÓFILOS ENVEJECIDOS

Puesto que el fallo en el reclutamiento de neutrófilos envejecidos ocurre a nivel del rodamiento, y este proceso requiere de interacciones con selectinas endoteliales, hipotetizamos que diferencias en la expresión de ligandos de selectina entre los neutrófilos frescos y envejecidos podrían dar cuenta del fenotipo diferencial de reclutamiento a tejidos inflamados. Para nuestra sorpresa, sin embargo, en los análisis transcriptómicos no observamos diferencias significativas en la expresión de los principales ligandos de selectinas en neutrófilos, incluyendo PSGL-1, CD44 y ESL-1 (no mostrado). Análisis de la capacidad de los neutrófilos frescos y envejecidos de unir las selectinas P y E en solución revelaron, de acuerdo con los datos transcripciones, diferencias modestas entre los neutrófilos frescos y envejecidos (**Figura 34**).



**Figura 34: Unión de selectinas solubles en neutrófilos frescos y envejecidos** en animales quiméricos WT:Bmal1<sup>ΔN</sup> o WT:CXCR4<sup>ΔN</sup> medida por citometría de flujo. Intensidad mediana de fluorescencia (izquierda) de E-selectina (**A**) y P-selectina (**B**) unida a sus ligandos en la superficie de los neutrófilos y gráficos representativos de citometría. N=4-5 animales por grupo. Estadística: test t de Student pareado entre el mutante y su control WT interno. \*, p<0.05; \*\*, p<0.01.

En conjunto estos datos apuntan a que es poco probable que la biosíntesis de ligandos de selectina sea la causa de las diferencias en la eficiencia de rodamiento y posteriores adhesión y extravasación (**Figura 31C**) entre los neutrófilos frescos y envejecidos.

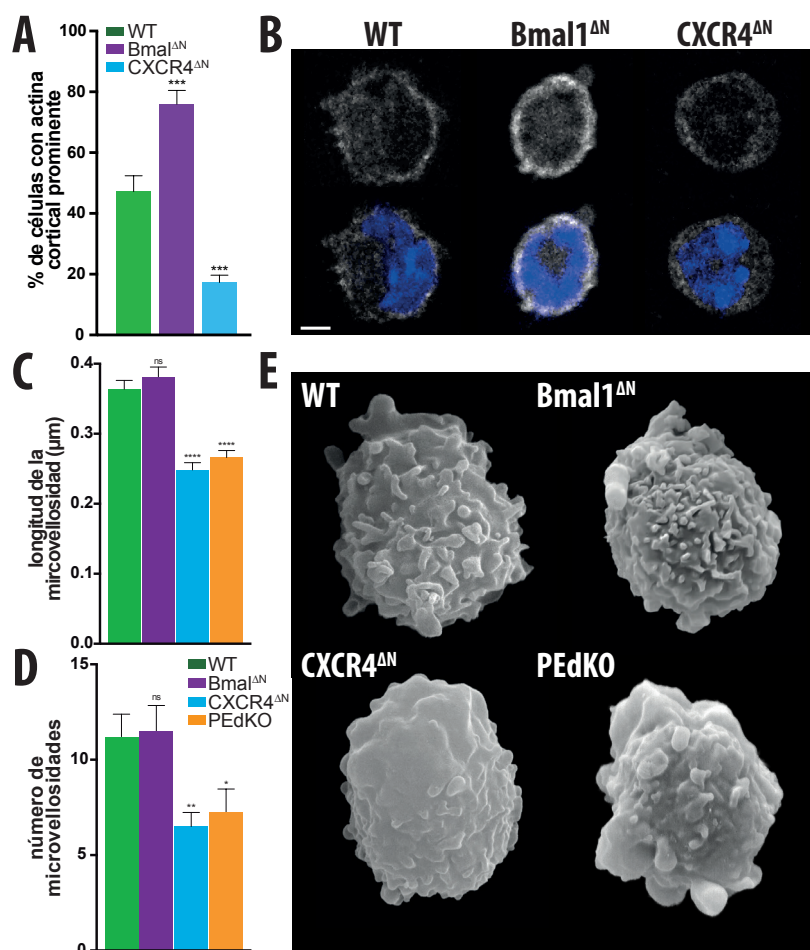
Decidimos testar la posibilidad de que la causa de la baja eficiencia de rodamiento en los neutrófilos envejecidos se deba no tanto a la presencia de ligandos de selectina sino a la topología de la célula, un parámetro que es esencial para una presentación correcta de los ligandos a las selectinas endoteliales. La topología superficial de los neutrófilos depende de la presencia de microvellosidades en su superficie, en cuyos extremos se localizan los ligandos de selectina (como PSGL-1) para poder vencer la separación física entre selectinas y ligandos que impone el glicocáliz de las células endoteliales ([Schmidt et al. 2011](#)). Esta estructura microviliar externa es dependiente de un citoesqueleto cortical de actina intacto ([Simon et al. 2007](#)).

En nuestros análisis transcriptómicos observamos que la ruta bioquímica del citoesqueleto de actina se encuentra diferencialmente expresada en neutrófilos frescos y enveje-



cidos ( $-\log(p)=1,71$ , véase la **Figura 13A** y la **Tabla 5**). Esto sugiere que existen diferencias en el citoesqueleto de actina entre neutrófilos frescos y envejecidos. Con el objetivo de analizar la presencia de una red de actina cortical realizamos tinciones de beta-actina en neutrófilos purificados de animales WT, Bmal1<sup>ΔN</sup> y CXCR4<sup>ΔN</sup>. Observamos que los neutrófilos Bmal1<sup>ΔN</sup> presentan mayor porcentaje de células con actina cortical prominente que los neutrófilos WT, mientras que ésta se muestra más desorganizada en neutrófilos CXCR4<sup>ΔN</sup> (**Figura 35A-B**). Esto podría indicar una deficiente formación de microvellosidades en superficie en los neutrófilos envejecidos.

Puesto que la presencia de actina cortical es únicamente indicia de la densidad de microvellosidades, decidimos analizar por microscopía electrónica de barrido la superficie intacta de los neutrófilos y así cuantificar directamente el número y longitud de las microvellosidades. El análisis de neutrófilos WT, Bmal1<sup>ΔN</sup>, CXCR4<sup>ΔN</sup> y PEdKO demostró que los neutrófilos envejecidos presentan menor longitud (**Figura 35C**) y menor número absoluto de microvellosidades en superficie (**Figura 35D-E**).



**Figura 35: Actina cortical y microvellosidades en neutrófilos frescos y envejecidos.** **A)** Cuantificación por microscopía confocal de la proporción de neutrófilos WT, Bmal1<sup>ΔN</sup> y CXCR4<sup>ΔN</sup> con una red de actina cortical prominente. N=122-301 células por grupo. **B)** Imágenes de inmunofluorescencia de la tinción de beta-actina (en blanco) y DAPI (en azul). Escala: 5 μm **C-D)** Cuantificación de la longitud (C) y del número (D) de microvellosidades en neutrófilos WT, Bmal1<sup>ΔN</sup>, CXCR4<sup>ΔN</sup> y PEdKO. N=167-325 microvellosidades de 23-29 células por grupo. **E)** Imágenes representativas de microscopía electrónica de barrido de las células cuantificadas en (C-D). Escala: 2 μm. Estadística: ANOVA de una vía.

Estos datos indican que el proceso de envejecimiento de los neutrófilos afecta a su citoesqueleto de actina, provocando un cambio en la microanatomía celular que afecta a su topología superficial y disposición de ligandos de selectina, lo que afectaría a su capacidad de rodamiento sobre el endotelio y, en última instancia, causaría una menor eficiencia de adhesión y extravasación de los neutrófilos envejecidos.

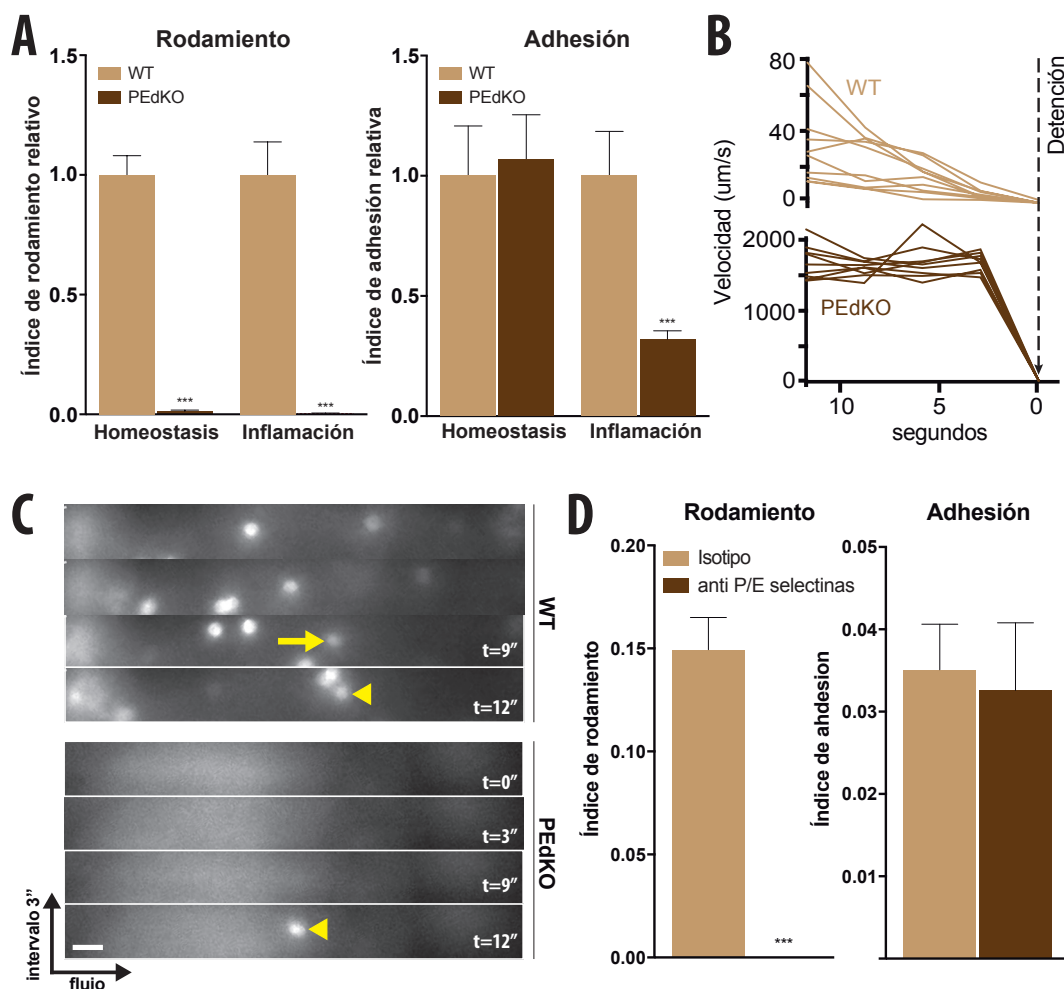
#### 4.3.4. RECLUTAMIENTO DEPENDIENTE E INDEPENDIENTE DE SELECTINAS

En conjunto, nuestros resultados muestran que los neutrófilos frescos son más eficaces a la hora de infiltrar tejidos inflamados, pero los neutrófilos envejecidos son más eficientes en la extravasación diaria homeostática en condiciones basales (**Figura 27**). Si la capacidad de rodamiento sobre el endotelio vascular de los neutrófilos envejecidos es menor, ¿cómo es posible que los neutrófilos envejecidos se extravasen eficientemente durante la fase homeostática de *clearance*?

Para tratar de responder a esta pregunta nos servimos de los animales PEdKO, cuya carencia de selectinas endoteliales los hace un modelo idóneo para analizar el tráfico de neutrófilos que tienen impedido el rodamiento. Utilizando microscopía intravital en la que los neutrófilos se marcaron específicamente con anticuerpo fluorescente contra Ly6G, analizamos el número de células en rodamiento o adhesión en condiciones de homeostasis e inflamación en animales WT y PEdKO. Para los análisis de microscopía intravital en homeostasis visualizamos la migración en la microvasculatura de la dermis (en oreja) en ausencia de cirugía y, por tanto, evitando provocar inflamación. La comparamos con la migración en condiciones inflamatorias en el modelo músculo cremaster tratado con TNF $\alpha$ .

El proceso de rodamiento de neutrófilos en la microvasculatura de la piel era evidente únicamente en los animales WT pero no, como era esperable, en los animales PEdKO por su carencia de selectinas endoteliales (**Figura 36A**, izquierda). Sorprendentemente, al cuantificar la adhesión en estado basal al endotelio vascular observamos que, aún en ausencia de selectinas, los neutrófilos eran capaces de adherirse normalmente (**Figura 36A**, derecha). Esta adhesión espontánea ocurría sin rodamiento previo en los animales PEdKO, de modo que la captura (*tethering*) en los vasos no estaba precedida de una reducción paulatina de velocidad como en un entorno WT (**Figura 36B-C** y **video suplementario 3**). La adhesión homeostática (es decir, no inflamatoria) en la microvasculatura de la piel es, por tanto, independiente de selectinas. En condiciones inflamatorias inducidas por TNF $\alpha$  en la microvasculatura del músculo cremaster, en cambio, la ausencia de selectinas provocó una reducción de los índices tanto de rodamiento como de adhesión (**Figura 36A**).

Confirmamos esta observación en animales WT en presencia de anticuerpos bloqueantes contra selectinas P y E o un control isotópico (**Figura 36D**). Esta serie de experimentos demostró que la captura de neutrófilos en condiciones homeostáticas no requiere rodamiento sobre selectinas, lo que sugiere que su salida a tejidos en condiciones basales es posible aún cuando la maquinaria de rodamiento es deficiente (**Figura 35**).



**Figura 36: La adhesión espontánea en homeostasis es independiente de selectinas.**

**A)** Rodamiento y adhesión de neutrófilos en ratones WT y PEdKO en homeostasis (dermis) e inflamación (cremaster estimulado con TNFα). Los datos se presentan normalizados al animal WT. N=50-55 vénulas de 4-5 animales (homeostasis) y 25-27 vénulas de 3-5 ratones (inflamación). **B)** Velocidad de los neutrófilos hasta la adhesión firme. En ratones PEdKO los neutrófilos no reducen paulatinamente su velocidad, como en el animal WT, pues no realizan la fase de rodamiento. Se muestran las curvas de 9 células por grupo. **C)** Imágenes representativas de dos capturas previas al momento del arresto del neutrófilo, capturadas a intervalos de tres segundos. La flecha señala al mismo neutrófilo en los distintos fotogramas hasta el momento de la adhesión firme (punta de flecha). **D)** Índices de rodamiento y adhesión de neutrófilos en animales WT tratados con anticuerpos bloqueantes contra selectinas P y E endoteliales. N=59-72 vénulas de 4-5 animales por grupo. Estadística: test t de Student no pareado. \*\*\*,  $p < 0.001$ .

En resumen, en esta sección demostramos que los neutrófilos frescos tienen mayor capacidad de migración a las zonas inflamadas (**Figura 28**, **Figura 29**, **Figura 33**), debida a una mayor eficiencia de rodamiento en el endotelio vascular (**Figura 31**). Este defecto en rodamiento no se debe a la ausencia de ligados de selectinas (**Figura 34**), sino a la regulación durante el proceso de envejecimiento del citoesqueleto de actina (**Figura 13**). Esto se traduce en cambios en la microanatomía de la célula, disminuyendo la cantidad de microvellosidades (**Figura 35**) en cuyos extremos se presentan los ligandos de selectinas.

Estos cambios hacen que los neutrófilos envejecidos sean menos aptos para extravasarse a los tejidos inflamados, aunque sí emigran eficientemente en condiciones homeostáticas desde la circulación hacia los tejidos (**Figura 27**). Nuestras observaciones sugieren que esto probablemente se debe a que la adhesión espontánea de los neutrófilos al endotelio vascular en condiciones basales es, al menos en piel, independiente de selectinas (**Figura 36**).

## 4.4. Papel de neutrófilos frescos y envejecidos en modelos de enfermedad

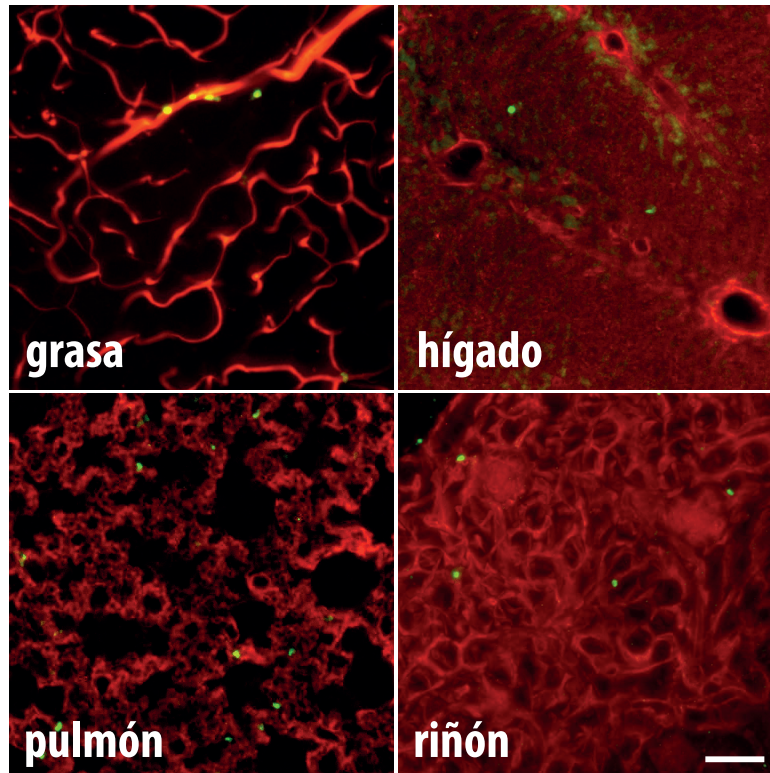
A continuación nos preguntamos cuál es el objeto del proceso de envejecimiento de los neutrófilos, dado que son las células frescas las que responden preferentemente frente a estímulos inflamatorios. Consideramos que si se tratara de la mera eliminación de los neutrófilos de circulación para evitar posibles daños a la vasculatura, no habría ninguna razón aparente para mantener una producción diaria tan masiva de estas células. Por tanto, hipotetizamos que los neutrófilos que salen de circulación hacia los tejidos cumplen un papel inmune dentro de ellos.

### 4.4.1. MODELOS DE INFECCIÓN

Para tratar de analizar esta cuestión comprobamos el comportamiento de animales con neutrófilos constitutivamente frescos o envejecidos en distintos modelos de enfermedad. Los resultados en el modelo de infarto cerebral presentados anteriormente apuntaron que la mayor migración de los neutrófilos frescos contribuye a daño inflamatorio (véase la **Figura 29**). Es importante enfatizar que en ese caso se trata de un tejido que carece de neutrófilos en el estado basal, mientras que en la mayoría de tejidos se da una infiltración homeostática de neutrófilos envejecidos desde la sangre, que tiene una función desconocida. Especulamos, por tanto, que la infiltración circadiana de neutrófilos envejecidos en el estado basal podría conferir inmunidad circadiana contra la posible infección de patógenos en lugar de ser, como se ha asumido hasta ahora, una mera forma de eliminación.

Para testar esta hipótesis recurrimos a la **infección sistémica con *Candida albicans***, un modelo de infección dependiente de neutrófilos que afecta principalmente al riñón ([MacCallum 2009](#)). A diferencia de cerebro, éste y otros tejidos están poblados por neutrófilos en el estado basal (**Figura 29A** y **Figura 26**). Confirmamos estos resultados por inmunotinción de tejido entero transparentado y verificamos la presencia de neutrófilos en riñón (**Figura 37**).



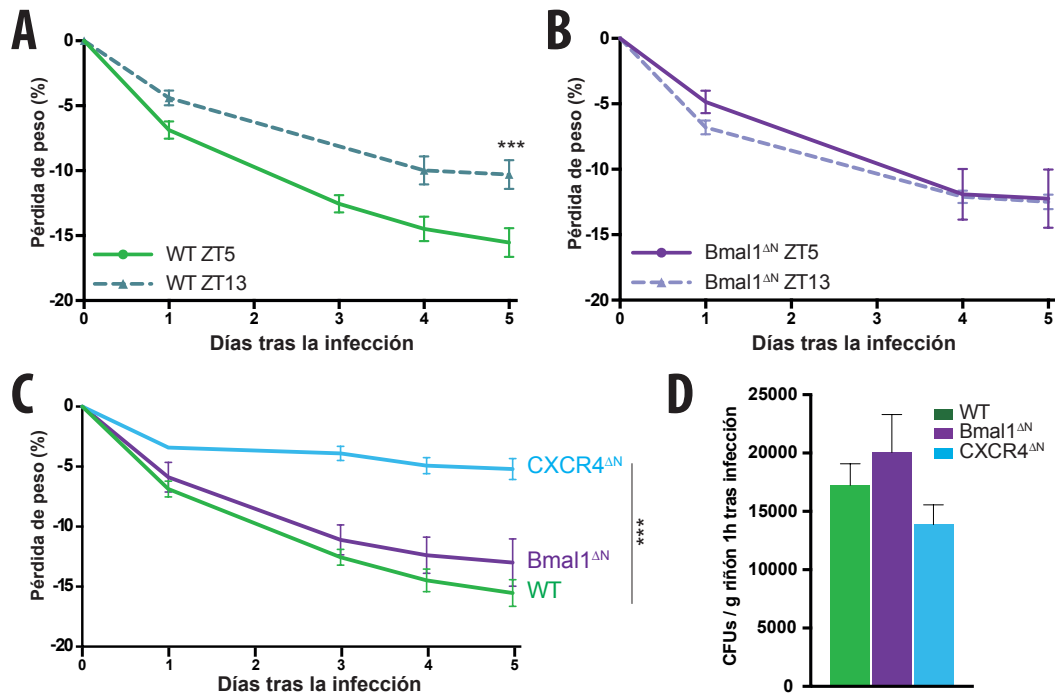


**Figura 37: Presencia de neutrófilos en el riñón y otros tejidos.** Volvimos a corroborar la presencia de neutrófilos extravasados en el riñón y otros tejidos con técnicas de inmunotinción de órgano entero y trasnparentizado de tejidos. Escala: 100µm. En rojo, CD31 (vasos) y en verde Mrp14 (neutrófilos). N=2-3 animales por tejido.

Para determinar inicialmente si este modelo es sensible a inmunidad circadiana, infectamos animales WT a ZT5 y ZT13. En estos experimentos medimos la respuesta a la infección por pérdida de peso durante 5 días. Observamos que los ratones infectados a ZT5 eran más susceptibles a la infección que los infectados a ZT13 (**Figura 38A**). Cuando repetimos el experimento en animales *Bmal1*<sup>ΔN</sup>, en los que no hay oscilación de neutrófilos envejecidos (**Figura 19**), observamos que se perdían las diferencias entre la inoculación a una hora u otra (**Figura 38B**). La pérdida de peso en estos animales quedaba a un nivel intermedio entre la respuesta del WT a ZT5 y a ZT13. Estos datos sugieren que el envejecimiento de los neutrófilos confiere inmunidad circadiana contra patógenos.

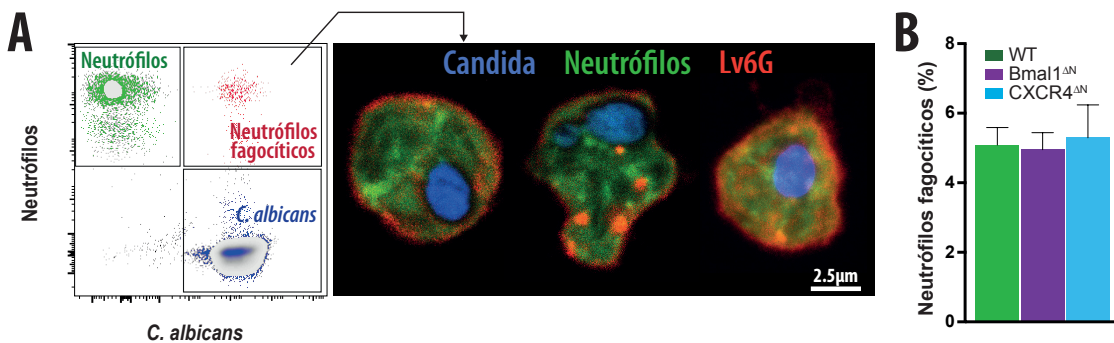
A continuación comparamos la infección de animales WT, *CXCR4*<sup>ΔN</sup> (con neutrófilos constitutivamente envejecidos) y *Bmal1*<sup>ΔN</sup> (con neutrófilos constitutivamente frescos). Sorprendentemente, observamos una dramática resistencia a la infección en los animales *CXCR4*<sup>ΔN</sup> (**Figura 38C**).

Dado que los neutrófilos envejecidos tienen menor capacidad para migrar a las zonas inflamadas, esto podría indicar que los animales *CXCR4*<sup>ΔN</sup> eliminan el hongo más eficientemente en circulación, antes de que llegue al riñón. Para evaluar esta posibilidad, analizamos el número de conidias de *C. albicans* capaces de llegar al riñón una hora después de la infección. Observamos que la eficiencia de anidamiento en el riñón era similar en los tres grupos de animales independientemente del estado de envejecimiento de los neutrófilos (**Figura 38D**). Estos datos indican que la diferente susceptibilidad de los distintos ratones mutantes a *Candida albicans* no está relacionada con el estado de envejecimiento de los neutrófilos en circulación.



**Figura 38: Los neutrófilos envejecidos proveen inmunidad circadiana contra *C. albicans*.** **A)** Pérdida de peso durante 5 días en animales WT tras la infección a ZT5 o ZT13. N=15-21 ratones por punto. **B)** Pérdida de peso durante 5 días en animales *Bmal1*<sup>ΔN</sup> tras infección a ZT5 o ZT13. N=5 ratones por punto. **C)** Comparación de la severidad de infección en animales WT, *Bmal1*<sup>ΔN</sup> o *CXCR4*<sup>ΔN</sup> a ZT5. N=12-14 animales por grupo. **D)** Cuantificación de unidades formadoras de colonias de *C. albicans* (CFUs) en el riñón una hora después de la inoculación. N=4-5 por grupo. Estadística: ANOVA de dos vías (A-C), test t de Student no pareado (D). \*\*\*, p<0.001.

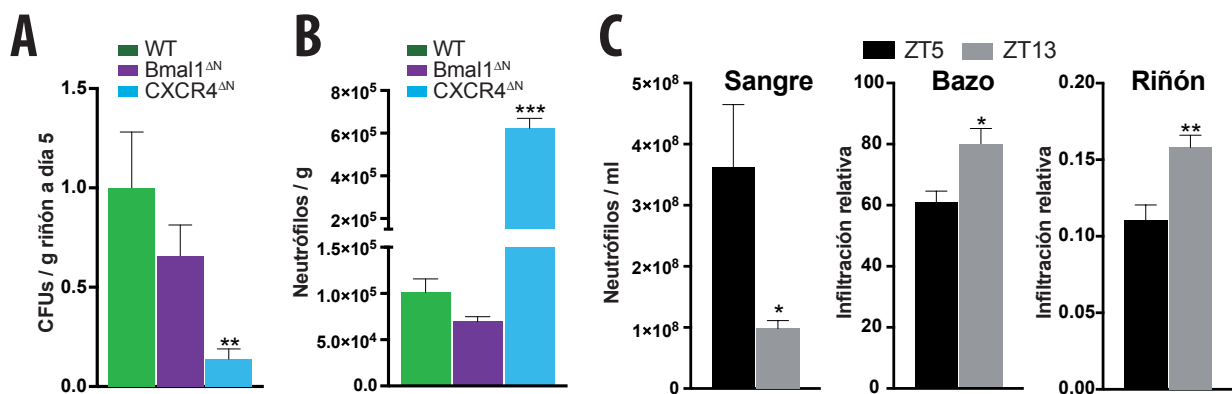
Una posibilidad alternativa para explicar la distinta susceptibilidad de los distintos mutantes a infección es que los neutrófilos envejecidos tuviesen mayor capacidad de fagocitar el patógeno, lo que daría cuenta de la mayor resistencia a la infección de los animales *CXCR4*<sup>ΔN</sup>. Para testarlo, analizamos la capacidad de los distintos tipos de neutrófilos de fagocitar *ex vivo* conidias de matadas por calor (HKCs, de *heat killed conidia*). El análisis de la captura de conidias fluorescentes por citometría de flujo y por microscopía confocal reveló de nuevo una capacidad fagocítica similar de los distintos neutrófilos (**Figura 39**).



**Figura 39: Los neutrófilos frescos y envejecidos fagocitan conidias de *C. albicans* con igual eficiencia.** **A)** Estrategia de análisis por citometría e imágenes de microscopía confocal y **B)** cuantificación del porcentaje de neutrófilos WT, *Bmal1*<sup>ΔN</sup> y *CXCR4*<sup>ΔN</sup> que fagocitan conidias de *C. albicans*. N=6 animales por grupo. Estadística: ANOVA de una vía (B).

La resistencia a infección de los animales CXCR4<sup>ΔN</sup> se tradujo en menor carga fúngica en el riñón (medida como número de unidades formadoras de colonias o CFU de *C. albicans*) 5 días después de la inoculación (**Figura 40A**). En vista de estos resultados, predijimos que la resistencia de los ratones CXCR4<sup>ΔN</sup> frente a infección podría deberse a la mayor capacidad de los neutrófilos envejecidos de infiltrar tejidos en homeostasis, antes incluso de la presencia de patógenos (**Figura 26** y **Figura 27**). Análisis de tejidos por citometría de flujo demostraron, efectivamente, una mayor presencia de neutrófilos en el riñón de los animales CXCR4<sup>ΔN</sup>, comparados con animales WT y Bmal1<sup>ΔN</sup> (**Figura 40B**).

Nuestros datos sugieren, pues, que la resistencia de los animales CXCR4<sup>ΔN</sup> contra infecciones se debe a la presencia previa en el riñón de neutrófilos envejecidos que han llegado desde la circulación durante la fase de *clearance*. Esto concuerda con el efecto de la inoculación a ZT5 o ZT13 de conidias en animales WT, que muestran mejor defensa a ZT13 (**Figura 38A**). Adicionalmente, el análisis del número de neutrófilos presentes basalmente en tejidos de animales WT demostró una mayor infiltración a ZT13 que a ZT5 (**Figura 40C**). Esto sugiere que la infiltración circadiana de neutrófilos envejecidos a los tejidos sirve para anticipar la posible invasión por patógenos.

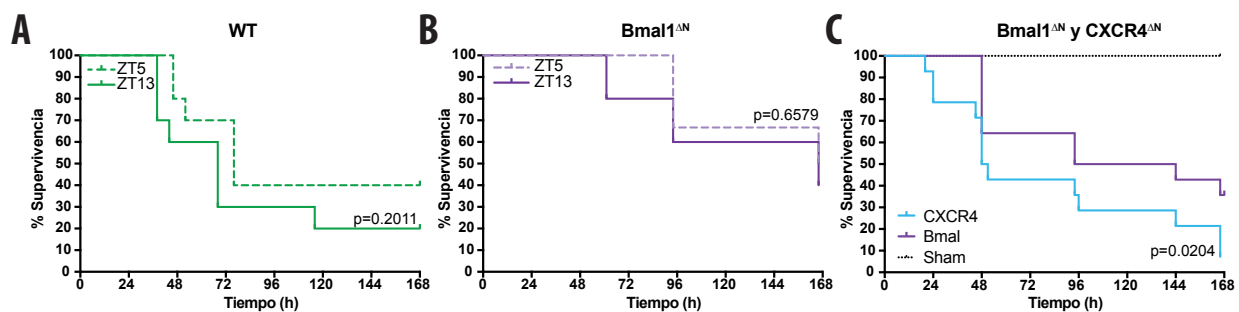


**Figura 40: Los neutrófilos extravasados en el riñón predicen resistencia circadiana contra *C. albicans*.** **A)** CFUs en riñón 5 días después de la infección. N=12-14 animales por grupo. **B)** Cuantificación del número de neutrófilos en el riñón en estado basal por citometría de flujo. N=4 ratones por grupo. **C)** Número de neutrófilos en sangre, bazo y riñón, normalizados a valores en sangre, en animales WT a ZT5 y ZT13. N=5 animales por punto. Estadística: ANOVA de una vía (A-B) y test t de Student no pareado (C). \*, p<0.05; \*\*, p<0.01; \*\*\*, p<0.001.

En resumen, la infección es combatida con más eficiencia en animales WT si son inoculados en el momento en que los neutrófilos envejecidos no se encuentran en circulación, sino en los tejidos (**Figura 38A**, **Figura 40C**). Esta fluctuación se pierde en animales Bmal1<sup>ΔN</sup> que no tienen activo el proceso de envejecimiento de los neutrófilos requerido para una salida homeostática eficiente de neutrófilos a los tejidos (**Figura 38B**). Los animales CXCR4<sup>ΔN</sup>, con neutrófilos constitutivamente envejecidos, tienen una gran resistencia a infección por *C. albicans* (**Figura 38C**, **Figura 40A**), lo que correlaciona con un mayor número de neutrófilos en el riñón en el estado basal que en los animales WT (**Figura 40B**). La máxima eficiencia contra la infección se da, por tanto, en el momento en que los ratones tienen más número de neutrófilos en los tejidos. Es interesante que esta infiltración está sincronizada con la fase activa de los ratones, que son animales nocturnos, y por tanto con el momento en que el organismo tiene más probabilidades de sufrir daño.

Para afianzar esta posibilidad, intentamos corroborar los resultados en un segundo modelo de infección bacteriana. En la **ligación y perforación cecal** (CLP, de *cecal ligation and puncture*), que modeliza la peritonitis y consecuente sepsis humana (Rittirsch et al. 2009), se produce un choque séptico y la liberación masiva de mediadores proinflamatorios que se conoce como “tormenta de citoquinas” que, en última instancia, provoca un fallo multiorgánico y la muerte (Huber-Lang et al. 2014). Los neutrófilos tienen un papel conocido en esta respuesta (Craciun et al. 2010). Por tanto, hipotetizamos que, de modo análogo a infección con *C. albicans*, la mortalidad sería mayor a ZT13 y en animales CXCR4<sup>ΔN</sup>, situaciones ambas en las que hay más neutrófilos extravasados en los tejidos.

Efectivamente, los análisis de supervivencia de los animales WT mostraron peor supervivencia a ZT13 (**Figura 41A**). Aunque no se alcanzó significancia, la tendencia sugiere que la presencia de neutrófilos en tejido contribuye al agravamiento del choque séptico. Para verificar si la ritmicidad impuesta por el proceso de envejecimiento en los neutrófilos tiene un papel en la supervivencia evaluamos la respuesta de animales Bmal1<sup>ΔN</sup> sometidos a CLP. Observamos que la diferencia entre ZT5 y ZT13 se pierde completamente en estos animales (**Figura 41B**). Esto indica que el proceso de envejecimiento de los neutrófilos es relevante en la mortalidad por sepsis. Finalmente, los análisis de supervivencia a ZT5 en los animales Bmal1<sup>ΔN</sup> y CXCR4<sup>ΔN</sup> revelaron mayor mortalidad en los animales CXCR4<sup>ΔN</sup> (**Figura 41C**). Estos resultados concuerdan con los obtenidos con *C. albicans*, en los que la respuesta inmune es más robusta cuando los neutrófilos están preferentemente en tejidos.



**Figura 41: La presencia de neutrófilos envejecidos en los tejidos se correlaciona con susceptibilidad al choque séptico.** **A)** Supervivencia de animales WT sometidos a CLP a ZT5 o ZT13. N=10 por punto. **B)** Supervivencia durante CLP en animales Bmal1<sup>ΔN</sup> a ZT5 y ZT13. N=5-6 por punto. **C)** Comparación entre la supervivencia durante CLP de ratones CXCR4<sup>ΔN</sup> y Bmal1<sup>ΔN</sup>. Los animales operados de igual manera pero sin punción del ciego (Sham) no mostraron ninguna mortalidad. N=14 por grupo. Estadística: análisis de supervivencia log-rank, con los p valores mostrados en cada curva.

#### 4.4.2. MODELOS DE INFLAMACIÓN VASCULAR

Si la presencia de neutrófilos en los tejidos guiada por el proceso de envejecimiento confiere una ventaja a la hora de eliminar microorganismos patógenos, como en el caso de *C. albicans*, ¿por qué dotar a este sistema eficiente de defensa de un patrón oscilatorio en lugar de mantenerlo constantemente activado? Una posible explicación proviene del hecho de que los neutrófilos son reconocidos mediadores de daño vascular, causando en

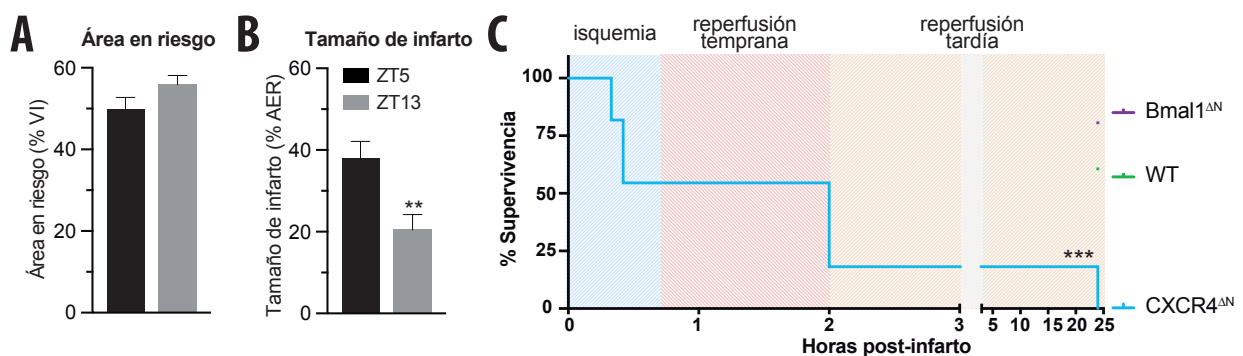


muchos casos daño irreversible a tejidos y muerte cuando se activan dentro de los vasos (Phillipson & Kubes 2011). Hipotetizamos, por tanto, que la presencia continuada de neutrófilos envejecidos en el torrente sanguíneo podría ser desventajosa, lo que justificaría que la evolución inmune haya optado en su lugar por un proceso dinámico que compaginara periodos de mayor defensa con periodos de reducción del número de neutrófilos en circulación.

Para analizar esta posibilidad usamos un modelo de daño intravascular por isquemia y reperusión, el **infarto de miocardio** inducido por ligación de la arteria coronaria descendiente izquierda. En este modelo la respuesta intravascular es clave (Frangogiannis et al. 2002), y nos permitía analizar el papel de los neutrófilos envejecidos en el daño intravascular.

Empezamos comprobando que el tamaño de infarto tiene un comportamiento circadiano dependiendo del momento de inducción de isquemia. Análisis del área ventricular muerta en ratones WT infartados a ZT5 (pico de neutrófilos envejecidos en circulación) y ZT13 (mínimo de neutrófilos envejecidos en circulación) mostraron que aunque no había cambios en el área en riesgo (**Figura 42A**), un parámetro que sirve como control de la cirugía, sí había una diferencia significativa en el tamaño de infarto (**Figura 42B**). Los animales presentaron un tamaño de infarto a ZT5 que doblaba al de ZT13. Esto podría indicar que la mayor presencia de neutrófilos envejecidos a ZT5 en circulación condiciona el tamaño de infarto.

Para evaluar la importancia de cambios intrínsecos en los neutrófilos en el daño vascular, sometimos a nuestros mutantes a infarto. Para nuestra sorpresa, ninguno de los 11 animales CXCR4<sup>ΔN</sup> sobrevivió al infarto (**Figura 43C**), muriendo la gran mayoría en la fase de isquemia o reperusión temprana (hasta las 2h tras la cirugía).



**Figura 42: Los neutrófilos envejecidos exacerban el daño durante el infarto de miocardio.** **A)** Área en riesgo y **B)** tamaño de infarto en ratones WT sometidos a isquemia-reperusión de la arteria coronaria a ZT5 y ZT13. N=9 animales por punto. **C)** Curvas de supervivencia tras infarto de miocardio en animales WT, Bmal1<sup>ΔN</sup> y CXCR4<sup>ΔN</sup>. N=9-11 animales por grupo. Estadística: test t de Student no pareado (A-B) o test de supervivencia log-rank (C). \*\*, p<0.01; \*\*\*, p<0.001.

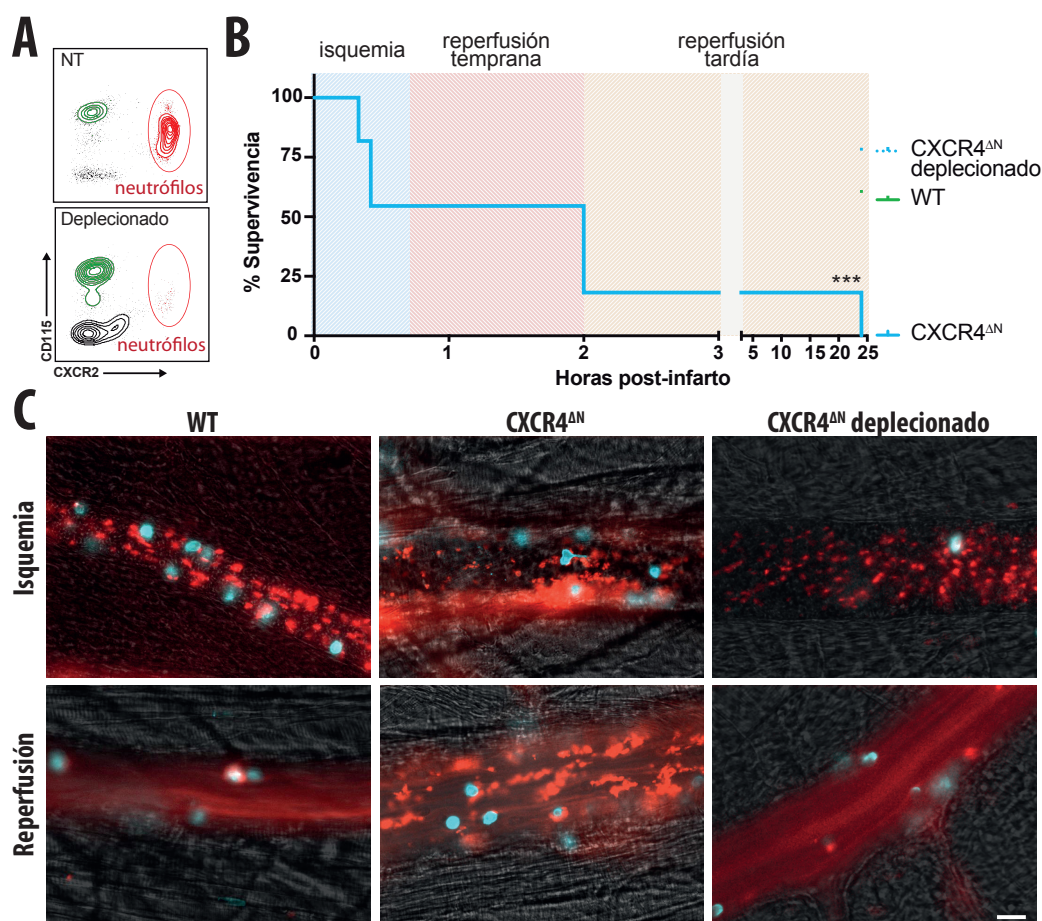
Para comprobar si este efecto en mortalidad por infarto era dependiente de neutrófilos, eliminamos los neutrófilos de la circulación de los animales CXCR4<sup>ΔN</sup> usando un anticuerpo deplecionante (**Figura 43A**). En estas condiciones, los animales CXCR4<sup>ΔN</sup> deplecionados de neutrófilos recuperaron una supervivencia comparable a la de los animales WT y Bmal1<sup>ΔN</sup> (**Figura 43B**).



Para tratar de comprender por qué morían los animales con neutrófilos constitutivamente envejecidos en circulación comenzamos por verificar si existía algún defecto previo en los corazones de estos animales. Análisis histológicos de estos corazones, sin embargo, no mostraron diferencias entre los animales WT y CXCR4<sup>ΔN</sup> en tinciones de hematoxilina y eosina (no mostrado). Para excluir problemas de conducción eléctrica, realizamos el análisis de estos corazones por electrocardiografía durante el infarto, pero tampoco encontramos diferencias (no mostrado).

En conjunto estos resultados demuestran que los animales CXCR4<sup>ΔN</sup> mueren a causa del fenotipo constitutivamente envejecido de sus neutrófilos en circulación.

Para analizar el comportamiento de estos neutrófilos envejecidos en condiciones de isquemia y reperfusión decidimos visualizar directamente este proceso dentro de los vasos por microscopía intravital de músculo cremaster sometido a isquemia y reperfusión, en presencia de anticuerpos fluorescentes contra neutrófilos (Ly6G) y plaquetas (CD41).



**Figura 43: Los neutrófilos envejecidos empeoran el infarto de miocardio.** **A)** Comprobación por citometría de flujo de la eliminación de neutrófilos circulantes in vivo en los animales CXCR4<sup>ΔN</sup>. **B)** Supervivencia tras infarto de miocardio en animales WT, CXCR4<sup>ΔN</sup> o animales CXCR4<sup>ΔN</sup> en los que se han deplecionado los neutrófilos de circulación. N=9-11 animales por grupo. **C)** Imágenes de microscopía intravital del músculo cremaster sometido a isquemia y reperfusión. Se muestran capturas durante la isquemia (arriba) y la reperfusión (abajo), leucocitos en azul (Ly6G en WT y CXCR4<sup>ΔN</sup>; y Ly6C en CXCR4<sup>ΔN</sup> deplecionado) y plaquetas en rojo. Imágenes representativas de 3 animales por grupo. Escala: 20 μm. Estadística: test de supervivencia log-rank (B). \*\*\*, p<0.001.

Inesperadamente, observamos que en los vasos de animales CXCR4<sup>ΔN</sup> se producían trombos diseminados sobre el endotelio vascular (**Figura 43C** y **vídeo suplementario 4**), generalmente cerca de neutrófilos adheridos marcados con Ly6G o de fragmentos celulares Ly6G positivos. Éstos aparecían ya durante la fase de isquemia y durante perfusión continuaban adheridos o bien se liberaban y eran arrastrados por el flujo. En los animales WT no pudimos encontrar estructuras similares. Para corroborar de nuevo que se trataba de un proceso dependiente de neutrófilos, analizamos el comportamiento de animales CXCR4<sup>ΔN</sup> previamente deplecionados de neutrófilos. En ausencia de neutrófilos no fuimos capaces de observar trombos diseminados como en los animales CXCR4<sup>ΔN</sup> indicando que tanto el fenómeno trombótico, como la muerte del animal estaban causadas por neutrófilos envejecidos en circulación.

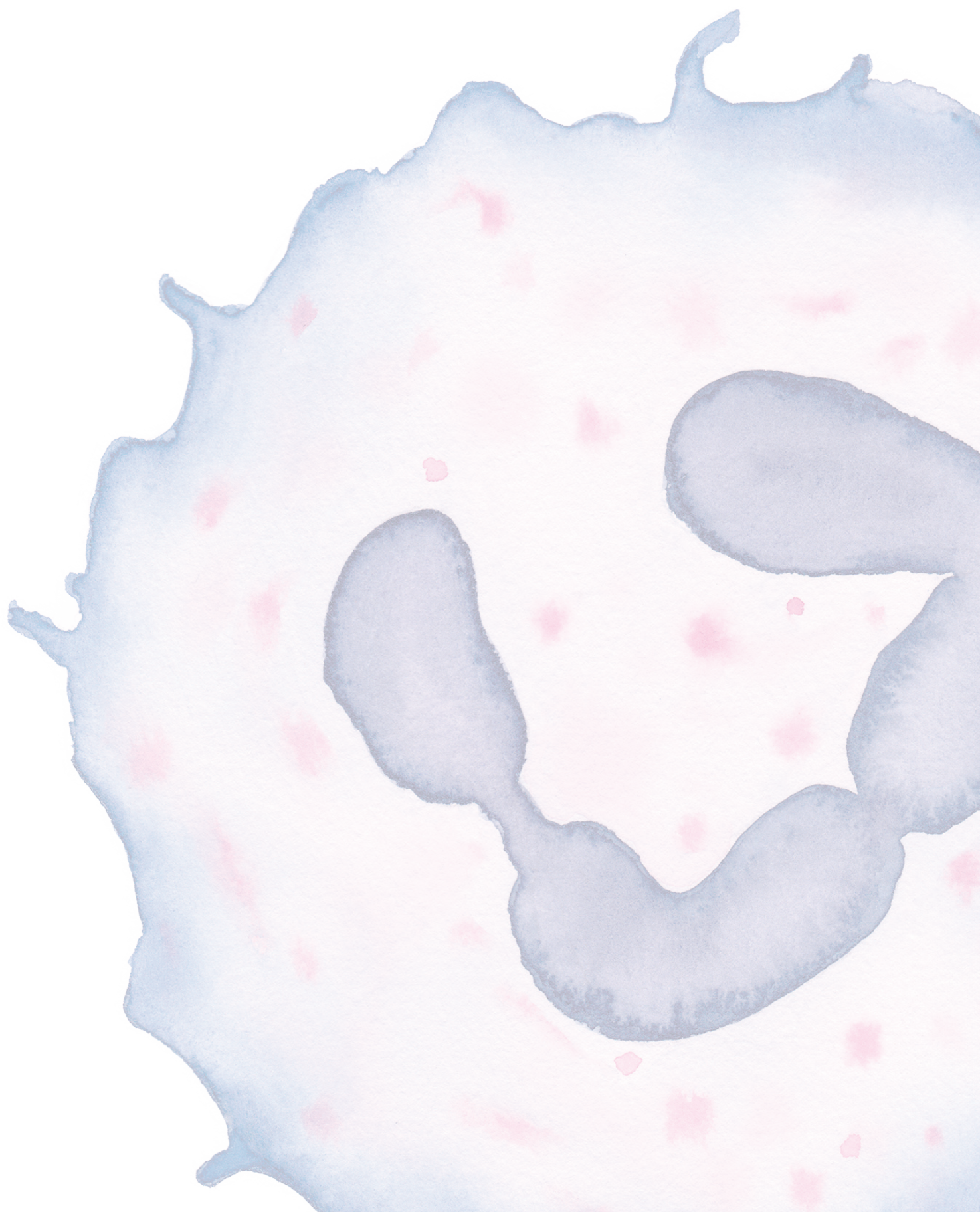
En conjunto, los datos del modelo de infarto sugieren que la presencia de neutrófilos envejecidos en la vasculatura propaga el daño por isquemia/reperfusión, que se asocia con la aparición de trombos, y que estos procesos son neutrófilo-dependientes (**Figura 43**).

En resumen, los modelos de infección e inflamación sugieren que la presencia continuada de neutrófilos envejecidos es beneficiosa durante procesos infecciosos (**Figura 38**, pero es detrimento en caso de activación inmune descontrolada (**Figura 41**), o durante inflamación vascular (**Figura 42**, **Figura 43**). Por el contrario, la incapacidad genética de generar neutrófilos envejecidos (en animales Bmal1<sup>ΔN</sup>) previene la infiltración homeostática de tejidos (**Figura 27**) y elevaciones en inmunidad anti-microbiana en determinados momentos del día (**Figura 38**). Proponemos que el sistema inmune ha optado por un sistema dinámico de regulación basado en fluctuaciones circadianas que permite controlar infecciones a la vez que previene inflamación vascular. Esto es posible gracias a una compartimentación temporal y espacial de los neutrófilos que se genera gracias a su proceso de envejecimiento. Véase un resumen gráfico (**Figura 44** y **Figura 45**) en la discusión.





## 5. Discusión







**E**n este trabajo hemos demostrado que el proceso de envejecimiento de los neutrófilos tiene implicaciones en homeostasis e inflamación, mediante el control del tráfico de los neutrófilos desde la circulación hacia los tejidos. Este proceso confina temporal y espacialmente la respuesta de éste leucocito, en una solución de compromiso que permite una eficiente defensa circadiana en tejidos y evita una respuesta desmesurada tanto en circulación como en tejidos.

Los neutrófilos se han considerado clásicamente como células efectoras de vida corta cuya única función parecía ser infiltrar los tejidos en caso de infección y fagocitar a los microorganismos invasores. Estudios en las últimas décadas están revelando, sin embargo, que los neutrófilos son células multifuncionales, con un papel en homeostasis y en el control de la respuesta inmune adaptativa (Nicolás-Ávila et al. 2017). Lejos de ser una población uniforme, nuestro trabajo demuestra que los neutrófilos muestran heterogeneidad temporal en circulación controlada de forma intrínseca por el reloj molecular.

Esta heterogeneidad controlada temporalmente tiene potenciales implicaciones en varios escenarios de importancia clínica, incluyendo procesos agudos con conocida susceptibilidad circadiana como el infarto de miocardio, el choque séptico, el infarto cerebral o el daño pulmonar agudo (Sundar et al. 2015; Scheiermann et al. 2013; Muller et al. 2010). En definitiva, esta propiedad biológica parece afectar a los procesos tromboinflamatorios, que son una de las principales causas de muerte en el mundo (Raskob et al. 2014) con 10 millones de casos anuales según la Organización Mundial de la Salud. Los procesos tromboembólicos son, de hecho, la primera causa de muerte intrahospitalaria y supone un gran coste en términos económicos a los sistemas de salud, 66 millones de euros anuales tan solo en España (Arrayas & Fernández 2012).

De nuestro trabajo se deduce que los neutrófilos son contribuyentes netos a estos procesos, y que el control clínico del proceso de envejecimiento de estas células podría tener interés terapéutico en pacientes con estas afecciones.

## 5.1. El mecanismo del envejecimiento de los neutrófilos

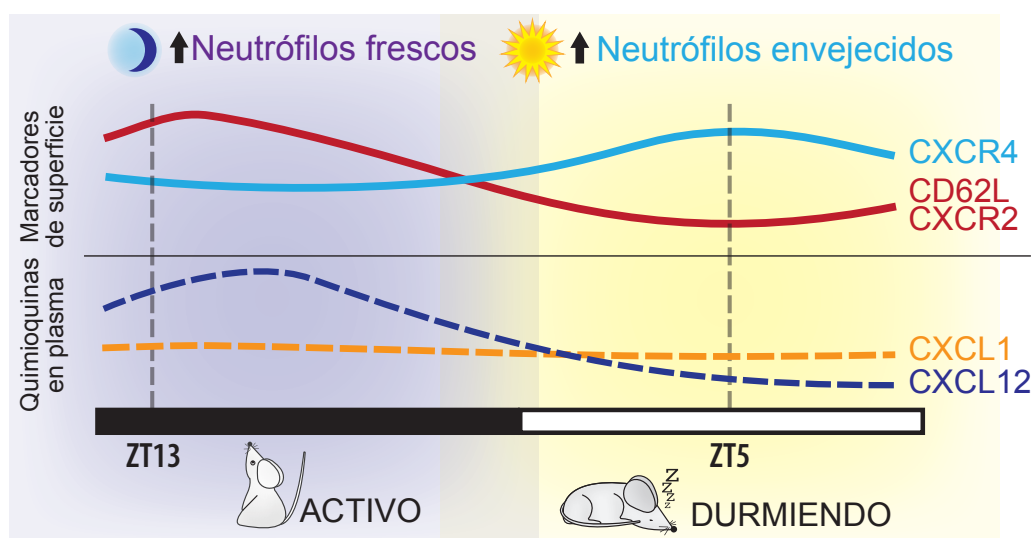
El número de neutrófilos en circulación muestra una oscilación circadiana (**Figura 12**), al igual que su fenotipo (**Figura 14**). El mecanismo mediante el cual se producen estos cambios fenotípicos, y que subyace al proceso de envejecimiento de los neutrófilos, está pobremente definido. Hemos demostrado que este proceso es un programa transcripcional global que afecta a gran variedad de rutas bioquímicas en los neutrófilos (**Figura 13**). Entre ellas se encuentran múltiples rutas relacionadas con la respuesta inflamatoria, la quimiotaxis o la apoptosis, lo que sugiere que los neutrófilos frescos y envejecidos tienen diferente respuesta ante procesos inflamatorios. Esto demuestra que hay heterogeneidad temporal en los neutrófilos circulantes, y contradice la visión clásica de que los procesos transcripcionales son poco importantes en la fisiología de los neutrófilos dada su corta vida en circulación (Silvestre-Roig et al. 2016).

Dado el comportamiento circadiano de los neutrófilos, nos centramos específicamente en genes afectados que forman parte del reloj molecular, y demostramos que este programa se encuentra activo en los neutrófilos circulantes (**Figura 15**), porque: 1) varios de los componentes del reloj molecular muestran fluctuaciones circadianas en neutrófilos circulantes, y 2) la eliminación de *Bmal1*, uno de los componentes principales del reloj, interrumpe el proceso de envejecimiento.

Este trabajo ha permitido confirmar también la variación circadiana en marcadores de superficie descritos anteriormente (CD62L y CXCR4), y ha identificado un nuevo marcador (CXCR2). Este marcador es particularmente útil porque es más resistente a la manipulación de las células *ex vivo* que CD62L o CD11b (ambos muy sensibles a la activación) y, por tanto, consideramos que facilitará análisis posteriores del proceso de envejecimiento (**Figura 44**). Hemos generado, además, ratones mutantes neutrófilo-específicos deficientes en los genes que codifican para *Bmal1*, CXCR2 y CXCR4, que recapitulan el fenotipo fresco (CXCR2<sup>ΔN</sup> y *Bmal1*<sup>ΔN</sup>) o envejecido (CXCR4<sup>ΔN</sup>) de los neutrófilos (**Figura 18**, **Figura 20**), y que deberían ser útiles para investigar la aportación específica de los neutrófilos frescos y envejecidos a distintos procesos fisiológicos. Entre ellos, nos hemos centrado en *Bmal1*<sup>ΔN</sup> y CXCR4<sup>ΔN</sup>, dado que el mutante CXCR2<sup>ΔN</sup> no nos permitiría discriminar entre el efecto del envejecimiento y el papel preponderante de CXCR2 en la función migratoria de los neutrófilos. Técnicamente hemos robustecido nuestras conclusiones experimentales estudiando animales WT a dos tiempos (ZT5 y ZT13), y hemos usado un segundo modelo de neutrófilos envejecidos (PEdKO) para corroborar los resultados de CXCR4<sup>ΔN</sup>.

Los datos de los mutantes de pérdida o ganancia de función de CXCR4, CXCR2 y *Bmal1* (**Figura 18**, **Figura 21**), y los de diversos experimentos de inhibición cruzada entre CXCR4 y CXCR2 (**Figura 14**, **Figura 21**) nos han permitido proponer un modelo en el que *Bmal1* y CXCR2 promueven, mientras que CXCR4 inhibe, el envejecimiento de los neutrófilos (**Figura 25**). En este mismo sentido, en nuestros análisis de RNAseq hemos observado que en los neutrófilos frescos se encuentra regulada al alza la ruta de señalización por CXCR4 (**Figura 13**), y en los frescos la de IL-8 (uno de cuyos receptores es CXCR2).

CXCL12 y CXCL1, los principales ligandos de los receptores CXCR4 y CXCR2, respectivamente, fluctúan en antifase en plasma, y los niveles de CXCL12 se mantienen elevados durante el tiempo que los neutrófilos permanecen frescos en circulación (**Figura 15** y **Figura 44**). Esto sugiere que los niveles de CXCL12 en plasma controlan el momento en que comienza el proceso de envejecimiento de los neutrófilos inhibiendo la señalización a través de CXCR2. Experimentos preliminares sugieren que los neutrófilos también sufren el proceso de envejecimiento *ex vivo*, por lo que proponemos que señales extrínsecas (CXCL12 en plasma) e intrínsecas (el reloj molecular) al neutrófilo se coordinan para controlar el proceso de envejecimiento. En otras palabras, la regulación del eje CXCR2-CXCR4 por el factor de transcripción Bmal1 permitiría coordinar reguladores temporales internos con receptores de señales externas para regular de manera exquisita el envejecimiento de estas células. La identificación de este sofisticado “reloj celular” permite especular que éste es un proceso de alta relevancia fisiológica que ha sido refinado durante la evolución.



**Figura 44:** Los neutrófilos frescos muestran niveles elevados de CD62L y CXCR2 y bajos de CXCR4, y durante el proceso de envejecimiento cambian a un fenotipo envejecido con altos niveles de CXCR4 y bajos de CD62L y CXCR2. Los niveles de CXCL12 fluctúan de manera circadiana en plasma y frenan el envejecimiento de los neutrófilos durante la noche señalizando a través de CXCR4, el cual inhibe la señalización a través de CXCR2. A medida que los niveles de CXCL12 disminuyen en plasma se lanza el proceso de envejecimiento, que es dependiente de señalización por CXCR2, cuyo ligando CXCL1 también está presente en plasma.

Los neutrófilos sufren un proceso similar al de envejecimiento en condiciones *ex vivo*, donde no hay variaciones exógenas de quimioquinas. Por otro lado, los neutrófilos deficientes en Bmal1 no sufren el proceso de envejecimiento, lo que indica que es un proceso dependiente del reloj molecular. Aunque es posible que factores externos descritos recientemente (Zhang et al. 2015) modulen también este proceso, los experimentos con animales quiméricos en los que células WT y Bmal1<sup>AN</sup> coexisten en el mismo entorno muestran que neutrófilos deficientes en Bmal1 mantienen un fenotipo fresco comparados con los neutrófilos WT expuestos a idénticas condiciones fisiológicas (**Figura 18**), lo que apoya la conclusión

de que el proceso está controlado intrínsecamente. Por lo que el reloj molecular promueve el envejecimiento de los neutrófilos de forma intrínseca.

Los datos sugieren, por tanto, que la tendencia al envejecimiento es intrínseca y por defecto en los neutrófilos. No podemos excluir, sin embargo, que exista un control adicional del proceso por señales extrínsecas: la señalización a través de CXCR2 es necesaria para el envejecimiento y la de CXCR4 lo impide (**Figura 18**). Estos dos receptores de quimioquinas controlan el lanzamiento del envejecimiento y son capaces de integrar señales del medio. La señalización a través de CXCR4 inhibe la señalización a través de CXCR2, de modo que las fluctuaciones en plasma de CXCL12 (**Figura 44**) regulan de forma extrínseca el momento del día en que los neutrófilos inician el proceso de envejecimiento. Los neutrófilos se mantienen frescos mientras los niveles en plasma de CXCL12 son elevados, y envejecen cuando éstos disminuyen. Proponemos, por tanto, que programas intrínsecos y extrínsecos se coordinan para controlar el proceso de envejecimiento de los neutrófilos.

A pesar de la relevancia de estos genes, en este trabajo no hemos explorado aún el nexo de unión entre el reloj molecular y CXCR2, y éste es un importante proceso pendiente de clarificar. Hemos demostrado que tanto Bmal1 como CXCR2 promueven el proceso de envejecimiento, pues los neutrófilos deficientes en cualquiera de ellos permanecen frescos pero ¿cómo modula el reloj molecular la señalización por este receptor para provocar el envejecimiento celular? Encontramos que la eliminación de Bmal1 provoca un aumento en la expresión de CXCR2 en superficie concomitante con un fenotipo fresco (**Figura 18**), de modo que el control de Bmal1 sobre el proceso podría ser indirecto, regulando la señalización intracelular vía CXCR2. Alternativamente, especulamos con la posibilidad de que la señalización a través de CXCR2 suceda de forma autocrina bajo el control del reloj molecular, el cual regularía la expresión de ligandos para este receptor. Esta hipótesis requeriría que, en ausencia de Bmal1, la expresión de un putativo ligando de CXCR2 esté reducida, inactivándose de este modo la señalización vía CXCR2 y con un resultado similar a la ausencia del receptor (fenotipo CXCR2<sup>ΔN</sup>). En análisis transcriptómicos hemos identificado un posible candidato: CXCL2. Observamos que la expresión de este ligando muestra fluctuación circadiana ZT5-ZT13 y una expresión reducida en neutrófilos Bmal1<sup>ΔN</sup>. Si la hipótesis es correcta, el envejecimiento implicaría una ruta de señalización autocrina por CXCR2. En este escenario, el control externo vendría marcado por los niveles de CXCL12 en plasma, cuya señalización a través de CXCR4 frenaría el proceso. Es interesante que un proceso similar se ha descrito en monocitos, en los que la expresión endógena de CCL2 está bajo el control del reloj molecular (Nguyen et al. 2013), que de este modo controla la señalización a través de CCR2 y regula el tráfico de monocitos pro-inflamatorios.

Mientras que nuestros estudios apuntan claramente a una regulación intrínseca, un trabajo reciente propone un modelo alternativo de regulación del proceso de envejecimiento de los neutrófilos (Zhang et al. 2015). En este trabajo, Zhang y colaboradores proponen que el envejecimiento está controlado por señales procedentes de la microbiota, que señalizan a través del eje TLR2/4. Los autores causaron depleción de microbiota por tratamiento con un coctel de antibióticos, y observaron una disminución del número de neutrófilos CD62L<sup>LO</sup> envejecidos en circulación. En nuestras manos, sin embargo, este mismo protocolo no altera el estado de envejecimiento. Para confirmar esto de manera independiente, hemos utilizado animales quiméricos por trasplante de médula ósea, de modo que neutrófilos WT control y con afectación del envejecimiento coexistan en un entorno en el que el microbioma es idéntico para ambos. Este experimento reveló que las diferencias en el perfil

de envejecimiento se mantienen incluso tras deplecionar la microbiota con antibióticos (**Figura 22**), lo que demuestra que el proceso de envejecimiento es intrínseco al neutrófilo. En línea con estas observaciones, nuestros análisis transcriptómicos no muestran cambios en el adaptador Myd88 (necesario para la señalización por TLRs, (Zhang et al. 2015)) ni en TLR2, aunque sí un ligero aumento de TLR4 en los neutrófilos frescos. Es interesante además que, incluso si la señalización a través de TLRs fuera importante para el proceso de envejecimiento, esta vía es también susceptible a inhibición por CXCR4 (Kishore et al. 2004).

Los receptores CXCR2 y CXCR4 también están implicados en la retención de neutrófilos en la médula ósea (Eash et al. 2010). Concretamente, la señalización a través de CXCR4 promueve la retención en médula, mientras que la de CXCR2 promueve la movilización de neutrófilos hacia la circulación. Encontramos interesante el hecho de que el receptor que media retención en médula (CXCR4) sea el que frena el proceso de envejecimiento, mientras que el que favorece su salida a sangre (CXCR2) lo promueve. Esto sugiere que el efecto dual de estos receptores permite preservar un fenotipo fresco mientras los neutrófilos están en reserva en la médula, pero que una vez éstos entran en la circulación, se guían por los niveles en plasma de CXCL12 y CXCL1 (u otros agonistas de CXCR2) para comenzar el proceso de envejecimiento. En resumen, la función de ambos receptores parece orquestar de manera global la biología de los neutrófilos, al menos en condiciones homeostáticas.

## 5.2. Migración homeostática y defensa circadiana en tejido

En este trabajo hemos demostrado también que el proceso de envejecimiento de los neutrófilos es necesario para la correcta eliminación circadiana de éstos desde la sangre hacia los tejidos (*clearance*) (**Figura 26**, **Figura 27**, **Figura 37**). Esta migración homeostática es independiente de selectinas, al menos en la microvasculatura intacta de la piel, como hemos observado por microscopía intravital (**Figura 36**). Nuestros datos indican que el incremento circadiano de neutrófilos en los tejidos confiere un extra de inmunidad frente a infección (**Figura 38**, **Figura 40**), pero puede tener consecuencias no deseadas en caso de activación descontrolada (**Figura 41**) como se observa durante un choque séptico. En este sentido, se ha descrito que la resistencia a dosis subletales de lipopolisacárido intraperitoneal es mayor cuando se realiza durante el día que durante la noche (Scheiermann et al. 2012), en coincidencia con nuestro modelo de CLP, lo que de nuevo sugiere que la respuesta a inflamación sistémica se ve modulada por la presencia de neutrófilos en los tejidos.

En base a estas observaciones, sería interesante explotar estos mecanismos para controlar clínicamente el estado de envejecimiento de los neutrófilos y, consecuentemente, la presencia de neutrófilos en los tejidos. Una posibilidad que deseamos testar es el uso de Plerixafor (también conocido como AMD3100), un antagonista de CXCR4 que está aprobado para su uso en clínica. Especulamos que este antagonista podría promover el enveje-



cimiento y así potenciar la entrada de neutrófilos a los tejidos, con potenciales beneficios contra infecciones.

La migración homeostática de neutrófilos envejecidos desde la circulación a los tejidos es, al menos parcialmente, independiente de selectinas. Es interesante que la deficiencia de adhesión leucocitaria (LAD) de tipo I, causada por mutaciones de integrinas  $\beta 2$  en leucocitos, cursa con infecciones más graves que la LAD de tipo II, que surge por un déficit en la fucosilación de los ligandos de selectina (Hans D Ochs et al. 2013). En base a nuestro trabajo, hipotetizamos que en el LAD de tipo II la menor severidad puede deberse a que los neutrófilos envejecidos preservarían su capacidad de colonizar los tejidos. No obstante, puesto que en pacientes con LAD-II los neutrófilos frescos no pueden acceder eficientemente a los tejidos inflamados, es lógica la presencia de infecciones recurrentes (Etzioni et al. 1992). Esto subraya la no redundancia funcional de los distintos receptores de adhesión en procesos inmunes.

### 5.3. Migración como respuesta a estímulos inflamatorios

Los neutrófilos sufren el proceso de envejecimiento en circulación y cambian fenotípica y funcionalmente. Uno de los cambios más importantes identificados en este trabajo es su distinta capacidad de migración hacia los tejidos inflamados. Los neutrófilos frescos migran con mayor eficacia que los envejecidos al foco de inflamación (**Figura 28**, **Figura 31**, **Figura 33**), lo que sugiere que son más eficientes en la respuesta inflamatoria cuando tienen que llegar desde la sangre hasta el tejido. Mecanísticamente, encontramos que esto se debe a una menor capacidad de los neutrófilos envejecidos de rodar sobre el endotelio vascular (**Figura 31**). La reducción de este proceso se debe a cambios en la topología cortical de la célula, que a su vez altera la disponibilidad de los ligandos de selectina. Los neutrófilos envejecidos tienen menor número de microvellosidades (**Figura 35**), en cuya parte distal se deben localizar los ligandos de selectina para ser funcionalmente activos (Andrian et al. 1995). Esto explica la menor eficiencia de rodamiento y las subsecuentes reducciones en las eficiencias de adhesión y extravasación de los neutrófilos envejecidos. Especialmente relevante en este sentido es la observación de que los neutrófilos frescos, posiblemente a causa de su mayor capacidad de migración, agravan el daño en caso de isquemia cerebral en nuestro modelo de ictus (**Figura 29**). Estas diferencias también podrían explicar la mayor susceptibilidad a daño pulmonar agudo cuando los neutrófilos frescos son predominantes en sangre, a ZT13 (**Figura 30**), aunque la demostración formal requerirá experimentos adicionales cuando dispongamos de los mutantes en el fondo genético BALB/C.

Fuera del sistema inmune, el endotelio también muestra un comportamiento oscilatorio en cuanto a las moléculas de adhesión que presenta a los leucocitos circulantes (Scheiermann et al. 2012). Trabajos previos han sugerido que la migración preferencial de los neutrófilos a ZT13 respecto a ZT5 (por ejemplo en la **Figura 28**) se explica por cambios en el endotelio en lugar de cambios en el neutrófilo. El análisis funcional de

neutrófilos frescos y envejecidos en modelos genéticos en los que sólo los neutrófilos están afectados, así como de animales quiméricos nos ha permitido analizar el comportamiento de neutrófilos frescos y envejecidos simultáneamente, ante el mismo endotelio. Nuestros análisis demuestran que, en gran parte, la competencia para iniciar procesos de reclutamiento a tejidos emana de los neutrófilos, y que esta migración inflamatoria está favorecida en la población más fresca (**Figura 31**).

Es importante considerar que durante un proceso infeccioso se produce un aumento de la producción y liberación de neutrófilos en médula ósea, un proceso conocido como granulopoyesis de emergencia ([Manz & Boettcher 2014](#)) que aumenta el número de neutrófilos disponibles en sangre para ayudar a eliminar la infección. Ésta es dependiente de las citoquinas G-CSF y GM-CSF ([Zhan et al. 1998](#)), las cuales modulan el eje CXCL12-CXCR4 en médula y afectan específicamente a la expresión en superficie de CXCR4 en los neutrófilos ([Nagase et al. 2002](#)), lo que en último término promueve su liberación a la sangre. Los neutrófilos que se liberan en respuesta a inflamación deben ser especialmente aptos para infiltrar la zona inflamada lo más eficientemente posible, y muestran un fenotipo fresco. Ésta y otras consideraciones pueden explicar el origen de los cambios migratorios asociados al proceso de envejecimiento, y concretamente el que los neutrófilos frescos tengan mejor capacidad de migración hacia tejidos inflamados.

## 5.4. Papel de los neutrófilos envejecidos en el daño vascular

En este trabajo presentamos evidencias de que la presencia continuada de neutrófilos envejecidos en circulación favorece el daño vascular en procesos de isquemia/reperfusión, como es el caso del infarto de miocardio (**Figura 42**) o de la isquemia/reperfusión inducida en el músculo cremaster (**Figura 43**). El área infartada es mayor cuando los animales son sometidos a isquemia por la mañana (ZT5). Puesto que el daño por isquemia/reperfusión es primordialmente intravascular ([Jordan et al. 1999](#)), y ZT5 coincide con el máximo número de neutrófilos envejecidos en circulación, esto sugiere que son los neutrófilos circulantes, en lugar de los presentes en tejidos, los que toman un papel activo durante la isquemia/reperfusión. Al infartar a los animales CXCR4<sup>ΔN</sup>, con neutrófilos constitutivamente envejecidos, se produce una mortalidad del 100%. Esto correlaciona con la formación de trombos diseminados en la microvasculatura del músculo cremaster sometido a isquemia y reperfusión en estos animales. Notablemente, ambos procesos (trombosis y muerte) son neutrófilo-dependientes (**Figura 43**), puesto que la eliminación previa de neutrófilos circulantes los revierte. Esto demuestra que la activación intravascular de los neutrófilos envejecidos provoca daño vascular y trombosis diseminada. Una importante pregunta pendiente es, no obstante, cuál es la causa final de muerte de los ratones y cuál es la relación causal, si existe, entre el proceso trombótico y la muerte.

Para iniciar la búsqueda de posibles mecanismos, hemos analizado la dinámica de los trombos durante la reperfusión, y hemos observado que algunos de ellos se despegan de la pared endotelial y son arrastrados por el flujo. Por tanto, es plausible hipotetizar que la muerte que observamos en el infarto de miocardio de los animales con neutrófilos constitutivamente envejecidos se deba a procesos trombo-embólicos. El papel de los neutrófilos en la trombosis es bien conocido (Brühl et al. 2012), y en concreto se ha destacado el papel de la NETosis en este proceso (Pfeiler et al. 2016), puesto que éstas forman una superficie pro-trombótica (Fuchs et al. 2010). Por otro lado se ha descrito que los neutrófilos envejecidos son más eficientes produciendo NETs (Zhang et al. 2015), por lo que es plausible que esta trombosis neutrófilo-dependiente se origine por efecto de la NETosis intravascular de los neutrófilos envejecidos en condiciones de isquemia/reperfusión.

Nuestras observaciones preliminares usando un marcador de ADN extracelular identifican estructuras compatibles con NETs en la microvasculatura del músculo cremaster en condiciones de isquemia/reperfusión. Por tanto, será importante corroborar la capacidad de neutrófilos CXCR4<sup>AN</sup> de formar NETs y determinar si el daño neutrófilo-dependiente por isquemia/reperfusión puede reducirse mediante inhibición de la NETosis intravascular. Para ello, trataremos estos animales con Cl-amidina, un inhibidor de la enzima PAD4 necesaria para la citrulinación de las histonas que precede a la NETosis (Knight et al. 2014). Alternativamente, eliminaremos las NETs ya depositadas mediante tratamiento con DNasa I, que degrada el ADN extracelular y disuelve las NETs (Chen et al. 2014). El potencial de aliviar el daño vascular por isquemia/reperfusión mediante inhibición de este proceso es elevado y con posible aplicación clínica.

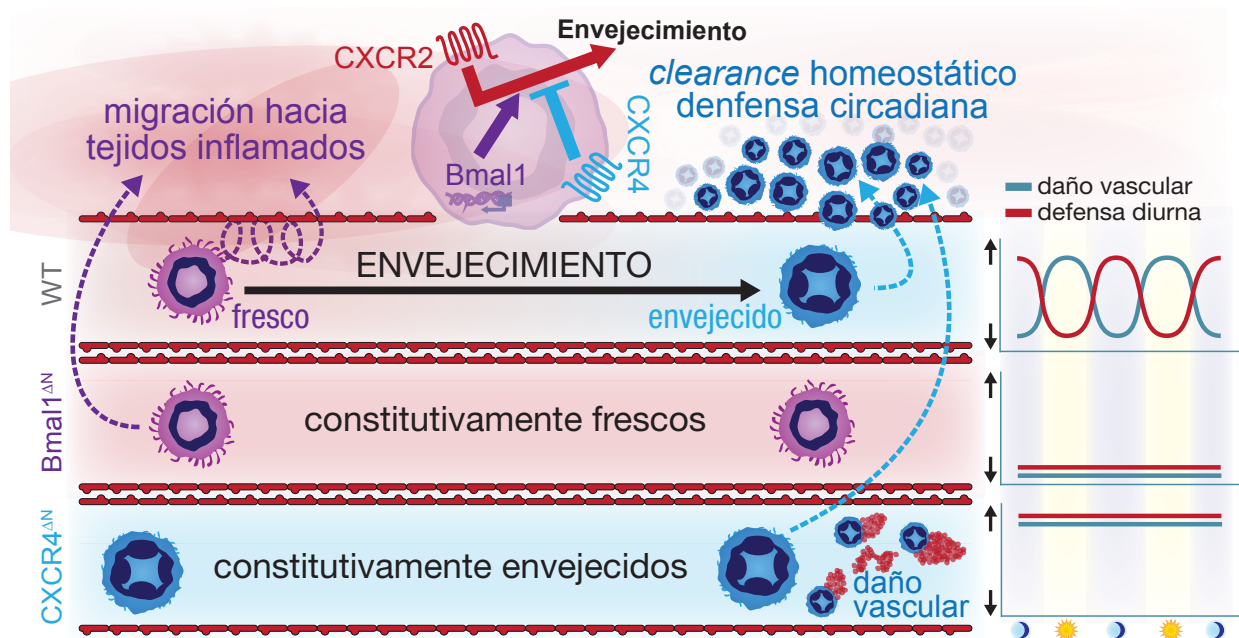
Estos datos sugieren, por tanto, que la presencia de neutrófilos envejecidos en circulación es desventajosa de cara al daño por un accidente cardiovascular. En este sentido es interesante observar que tanto la frecuencia como la severidad del infarto de miocardio en humanos muestra fluctuaciones diurnas, siendo ambas mayores durante el día y especialmente por la mañana (Suarez-Barrientos et al. 2011; Muller et al. 2010; Parker et al. 1994). Estos datos coinciden con el fenotipo envejecido de los neutrófilos en humanos por la mañana (Figura 24), lo que sugiere que mecanismos similares a los identificados en este trabajo podrían estar activos en accidentes cardiovasculares en humanos.

## 5.5. Actividad diurna, inmunidad circadiana y el ajuste evolutivo

Un aspecto interesante de este trabajo es la observación de que en humanos se mantiene un ritmo temporal de envejecimiento de los neutrófilos similar al el de ratón (Figura 24). *A priori* esperábamos encontrar ritmos antifásicos, porque hipotetizamos que este proceso, que tiene importancia para la defensa inmune, se habría optimizado para proporcionar la máxima defensa durante la fase activa del organismo. Es lo que ocurre en ratones, que son animales de actividad nocturna, y parecen haber adaptado su defensa a la noche, cuando la probabilidad de sufrir daño o infección es máxima. La observación de que en humanos,

cuya actividad es diurna, el patrón temporal sea casi idéntico al de ratones sugiere que existe una desconexión entre inmunidad y actividad, quizás porque el sistema esté gobernado por ciclos de luz/oscuridad y no por las fases de actividad del organismo.

En los vertebrados el reloj central circadiano tiene componentes comunes (retina, complejo pineal, núcleo supraquiasmático) y muchas disimilitudes entre diferentes clases e incluso dentro de una misma clase o familia, con la notable excepción de los mamíferos (Menaker et al. 1997). Pájaros, peces, ciclóstomos, reptiles y anfibios tienen múltiples fotorreceptores en la retina y también fotorreceptores extra-retinales (pineales, para-pineales o en cerebro profundo), mientras que los mamíferos utilizan exclusivamente fotorrecepción en la retina (Nelson & Zucker 1981). La hipótesis más extendida para explicar este hecho es que los mamíferos, quizás gracias a su capacidad de termorregulación, atravesaron un “cuello de botella” nocturno a lo largo de su evolución, es decir, los mamíferos ancestrales tenían un modo de vida nocturno que aseguraba mejor supervivencia en un mundo dominado por reptiles predadores diurnos (Menaker & Tosini 1996). En consecuencia, los mamíferos diurnos serían una radiación evolutiva secundaria derivada de ancestros nocturnos. Este cuello de botella evolutivo habría propiciado que todos los mamíferos tengan un reloj circadiano idéntico entre ellos, a diferencia del resto de vertebrados. Con todo ello, es plausible especular que el proceso de envejecimiento de los neutrófilos, dependiente en última instancia del reloj central, muestra idéntica fase en humanos (diurnos) y ratones (nocturnos) porque se trataría de un sistema evolutivamente arraigado en el modo de vida nocturno de los mamíferos ancestrales.



**Figura 45:** El proceso de envejecimiento, promovido por Bmal1 y CXCR2, y antagonizado por CXCR4, es un requisito previo para la movilización homeostática de los neutrófilos desde la sangre a los tejidos. La migración hacia tejidos inflamados, por otro lado, es más eficiente en los neutrófilos frescos. Este proceso oscilatorio de defensa circadiana en tejido permitiría optimizar el sistema evitando la presencia continuada de neutrófilos envejecidos en circulación, que pueden provocar daño vascular y agravar accidentes cardiovasculares.

## 5.6. Posibles funciones de neutrófilos envejecidos en tejidos

Clásicamente se ha considerado a los neutrófilos como células que salen a circulación, ejercen una función de vigilancia inmune y son eliminadas silenciosamente en tejidos especializados (médula ósea, bazo e hígado), todo en el lapso de un solo día ([Summers et al. 2010](#)). En las últimas décadas, no obstante, se empiezan a reconocer nuevos papeles de los neutrófilos tanto en estado basal como durante inflamación o cáncer, que están cambiando la visión clásica de los neutrófilos como células efectoras, para incluir funciones reguladoras que podrían estar relacionadas con el proceso de envejecimiento celular ([Adrover et al. 2016](#)). Por ejemplo, la infiltración circadiana de neutrófilos envejecidos en la médula ósea y su fagocitosis por macrófagos residentes provoca una reducción en los niveles de CXCL12 en médula, lo que promueve la salida de células madre y progenitoras a la circulación ([Casanova-Acebes et al. 2013](#)). Éstas, a su vez, tienen un papel preponderante en la inflamación ([Heidt et al. 2014](#)). Por otro lado, la fagocitosis de neutrófilos en tejidos extramedulares como el bazo o el pulmón por macrófagos residentes sirve para reprimir la transcripción de IL-23, una citoquina que regula la producción de IL-17 por células T, la cual induce la producción de G-CSF ([Stark et al. 2005](#)). Estos estudios señalan que los neutrófilos envejecidos son capaces de modular el nicho hematopoyético en homeostasis, bien en la médula ósea directamente o desde tejidos extramedulares. Esto sugiere que la capacidad de migración homeostática a los tejidos de los neutrófilos envejecidos puede ser importante en homeostasis y no solo de cara a la defensa inmune ([Nicolás-Ávila et al. 2017](#)).

Los neutrófilos envejecidos migran todos los días de la circulación a los tejidos. Hemos podido detectar cambios en el número de neutrófilos en varios tejidos a distintos tiempos del día (menos a ZT5 y más a ZT13), lo que indica que la infiltración de neutrófilos envejecidos sucede cuando éstos abandonan la circulación, y que su número en tejidos vuelve a bajar cuando la siguiente oleada de neutrófilos abandona la médula ósea. Esto sugiere que la vida de los neutrófilos que infiltran los tejidos es corta y sus números dependen del número de neutrófilos envejecidos en circulación, lo que a su vez implica un alto coste energético para que el organismo pueda mantener la producción y destrucción continuada de estas células. En consecuencia, la ritmicidad de este ciclo vital de los neutrófilos podría estar promoviendo respuestas fisiológicas ajustadas a determinados momentos del día en los tejidos que infiltran, de modo similar al descrito en médula ósea ([Casanova-Acebes et al. 2013](#)). Es interesante especular que una de las razones por las que se producen y eliminan cada día un número tan elevado de neutrófilos pueda tener que ver con la posibilidad de iniciar procesos rítmicos en otros tejidos. Por ejemplo, en modelos de obesidad experimental los neutrófilos promueven la resistencia a insulina degradando IRS1 (*insuline receptor substrate 1*) en adipocitos y hepatocitos por medio de la liberación de elastasa, lo que promueve la lipogénesis y la síntesis de colesterol ([Talukdar et al. 2012](#)). Pese a que la obesidad es un estado inflamatorio, los neutrófilos también están presentes en



el hígado en el estado basal, y será interesante testar si la infiltración circadiana de neutrófilos al hígado o al tejido adiposo regula algunos aspectos de su función metabólica.

Se ha descrito también que los neutrófilos promueven la angiogénesis en tejidos no vascularizados mediante la liberación de la metaloproteasa MMP9 (de *matrix metalloprotease* 9) que facilita la penetración de los vasos nacientes en el tejido (Christoffersson et al. 2012). Estos neutrófilos pro-angiogénicos muestran un fenotipo CXCR4<sup>HI</sup> CD49d<sup>HI</sup> (Massena et al. 2015), compatible con el de los neutrófilos envejecidos. Esto podría tener implicaciones en cáncer, pues la actividad de neutrófilos se ha asociado a una mejor vascularización y crecimiento de los tumores (Jablonska et al. 2010). Sería, por tanto, interesante explorar la posibilidad de manipular el estado de envejecimiento de los neutrófilos para promover o evitar, según convenga, sus acciones pro-tumorales en tejidos.

Dos tejidos abundantemente poblados por neutrófilos en el estado basal son el pulmón y el bazo (Figura 26). En el pulmón, la marginación de neutrófilos en la vasculatura está mediada por CXCR4; ésta población puede ser liberada de vuelta a la circulación mediante tratamiento con antagonistas de CXCR4 o con estímulos adrenérgicos (Devi et al. 2013), o bien infiltrar las vías aéreas en caso de inflamación (Kreisel et al. 2010). En el daño pulmonar agudo (TRALI), hemos demostrado que la mortalidad es mayor a ZT13 que a ZT5, coincidiendo con mayor infiltración en el pulmón (Figura 30). En el estado basal hay más neutrófilos retenidos en el pulmón a ZT13 que a ZT5, de modo que la mayor migración de los neutrófilos frescos en circulación junto con la mayor presencia previa de neutrófilos envejecidos marginados en la circulación pulmonar explicaría la mayor mortalidad a esta hora del día. Entender la contribución de estos neutrófilos marginados en el daño pulmonar sería importante para definir terapias durante inflamación pulmonar, sobre todo teniendo en cuenta que es posible la demarginación usando drogas ya disponibles.

En el caso del bazo también hay una abundante población de neutrófilos en el estado basal, localizada en la zona marginal que se ha llamado *B-helper* (ayudante de células B). Estos neutrófilos inducen supervivencia, hipermutación somática, cambio de clase y diferenciación a célula plasmática en los linfocitos B en la zona marginal de forma independiente de células T, y por otro lado son capaces de formar estructuras tipo NET tanto en homeostasis como en inflamación (Puga et al. 2011). Curiosamente, estos neutrófilos muestran bajos niveles de CD62L y altos de CD11b, un fenotipo compatible con neutrófilos envejecidos (los cuales también forman NETs más activamente que los frescos (Zhang et al. 2015)). Estos y otros trabajos sugieren que la infiltración homeostática de neutrófilos en tejidos participa en la respuesta inmune adquirida (Cerutti et al. 2013) y da cuenta de que los neutrófilos tienen un papel regulador en la interfase entre la inmunidad innata y adquirida (Mócsai 2013).

A este respecto, se ha descrito una población de neutrófilos que aparece en humanos tratados con bajas dosis de endotoxina y presenta bajos niveles de CD62L, un fenotipo compatible con el de los neutrófilos envejecidos. Estos neutrófilos son capaces de suprimir directamente la proliferación de células T mediante la liberación de ROS localmente en la sinapsis inmunológica (Pillay et al. 2012). Estos estudios revelan un nuevo nivel de capacidad reguladora sobre células del sistema inmune adaptativo, en este caso promoviendo la depresión inmunológica que podría estar relacionada con la disfunción inmune que muestran los pacientes con sepsis (Leliefeld et al. 2016). La relación de esta población con neutrófilos envejecidos o marginados en ciertos tejidos permanece desconocida.

En conjunto, esta serie de trabajos muestran que los neutrófilos tienen funciones más allá de su papel clásico como células anti-microbianas e inflamatorias, y en muchos de esos casos se han identificado marcadores que podrían ser compatibles con un fenotipo envejecido. Es posible que los distintos microambientes que los neutrófilos envejecidos encuentran en los tejidos determinen adicionalmente su actividad ulterior. Es el caso de neutrófilos del bazo, que sufren una “re-educación” por IL-10 producida por el endotelio esplénico (Puga et al. 2011). Es interesante que, en nuestro análisis de secuenciación masiva, los neutrófilos envejecidos, que potencialmente infiltrarán el bazo, expresan niveles mayores del receptor de IL-10.

## 5.7. Consideraciones finales y perspectivas de futuro

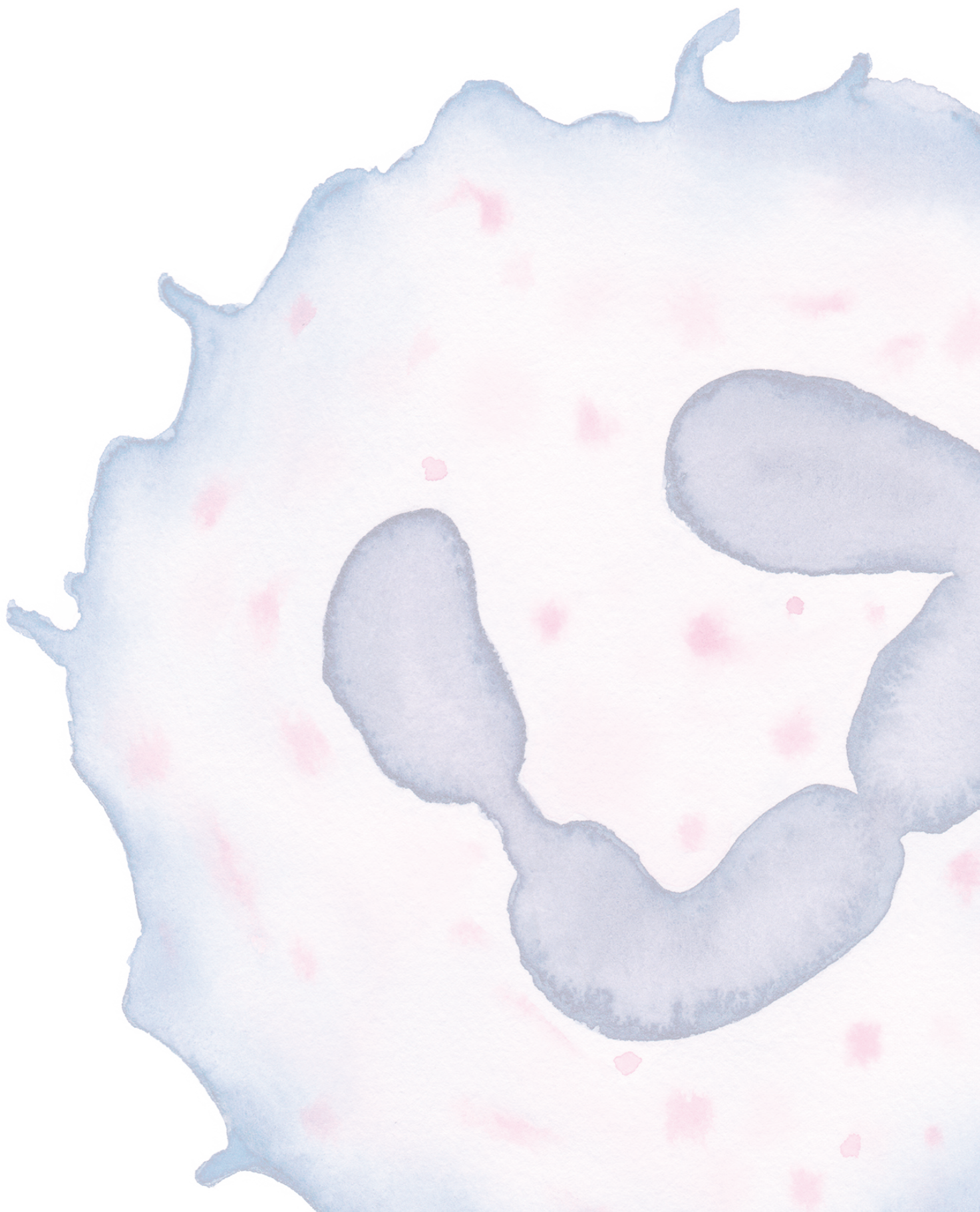
En conclusión, el proceso de envejecimiento está íntimamente asociado a la biología de los neutrófilos desde el momento en que son liberados a la sangre. Es intrigante que cada día se produzcan cientos de millones de neutrófilos que clásicamente se consideraba serían desechados pasadas unas pocas horas. El proceso parecería un malgasto de la economía energética del organismo, a menos que estos neutrófilos que han circulado tengan, como proponemos en este trabajo, funciones adicionales de defensa u otros papeles homeostáticos en los tejidos, que requieran un control espacio-temporal preciso. En este sentido, la necesidad de mantener bajo control la gran capacidad citotóxica de los neutrófilos puede haber sido un factor impulsor de la evolución de este sistema rítmico de control, que permite optimizar el balance entre defensa circadiana y riesgo de daño vascular.

El proceso de envejecimiento está controlado de manera intrínseca en el neutrófilo por el reloj molecular, pero es sensible a señales externas a través de los receptores de quimioquinas CXCR2 y CXCR4, que actuarían como interfaz entre el regulador interno y el medio. Este mecanismo genera una heterogeneidad temporal en los neutrófilos que se traduce en una infiltración oscilatoria de los tejidos con potencial implicación en diversos procesos fisiológicos. Asimismo, el microambiente en los tejidos que estos neutrófilos infiltran (por ejemplo, la zona marginal del bazo) podría determinar un segundo grado de heterogeneidad tisular. Así, el proceso de envejecimiento de los neutrófilos podría servir, adicionalmente, para controlar temporalmente diversas acciones homeostáticas de los neutrófilos sobre los tejidos.

En resumen, proponemos que el propósito del envejecimiento de los neutrófilos es una redistribución de éstos hacia los tejidos, donde pueden participar en múltiples procesos. Entre ellos se encuentra, como hemos demostrado, la defensa anticipatoria contra infecciones. No obstante, predecimos que los neutrófilos pueden, potencialmente, participar en muchos otros procesos fisiológicos, la mayoría de los cuales están aún por identificar.

El potencial clínico que tendría el control de estos procesos invita a continuar investigando el apasionante ciclo de vida de los pequeños “microfagos” de Metchnikov que, no cabe duda, aún tienen muchas historias que contar.

## 6. Conclusiones







## Conclusiones

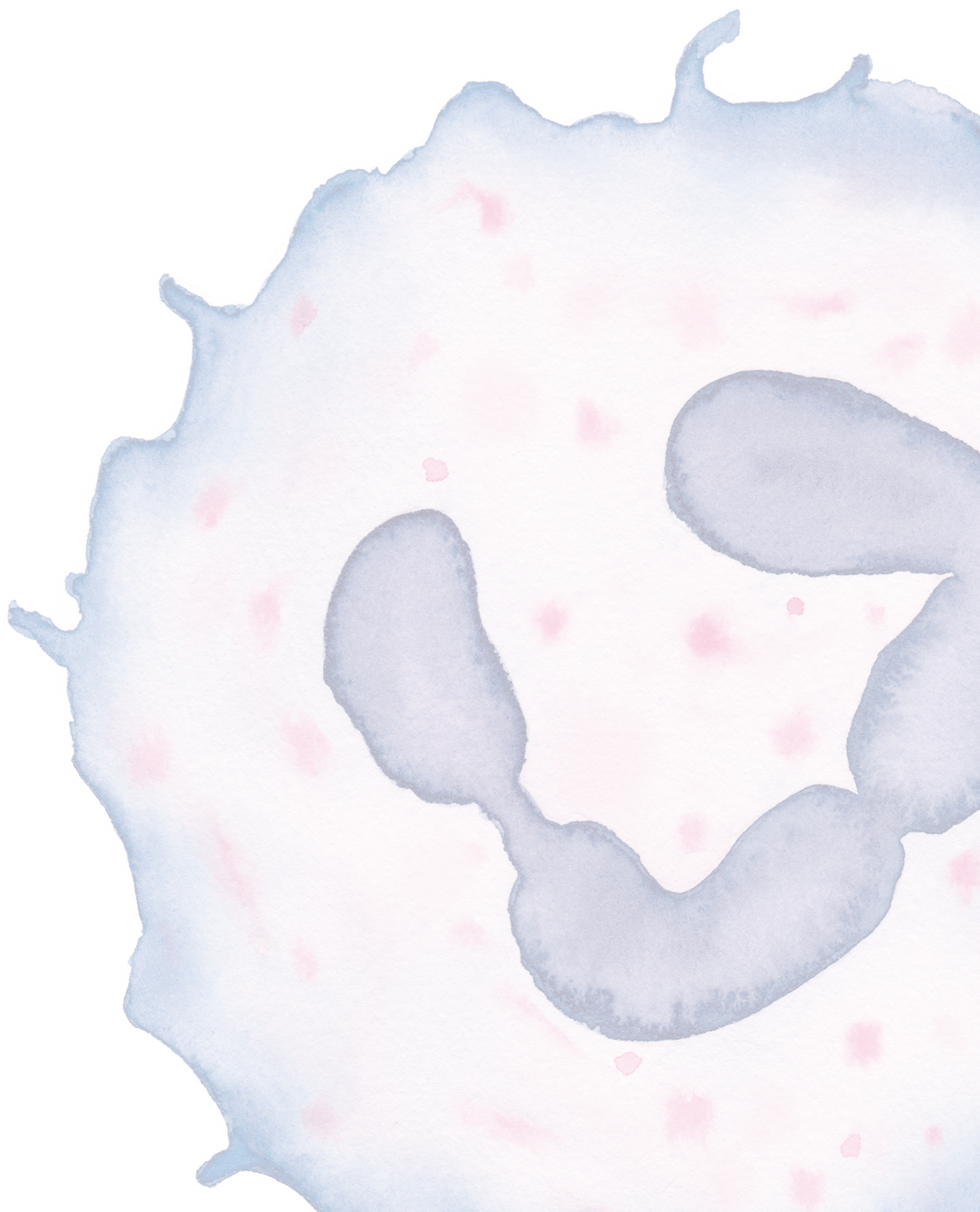
Los resultados presentados en este trabajo permiten extraer las siguientes conclusiones:

1. El proceso de envejecimiento de los neutrófilos es un programa transcripcional global que sucede durante su tránsito por la circulación y afecta a múltiples procesos celulares.
2. Los niveles en superficie de CD62L, CXCR2 y CXCR4 fluctúan temporalmente en los neutrófilos circulantes; los neutrófilos frescos muestran altos niveles de CD62L y CXCR2, y bajos niveles de CXCR4. Los neutrófilos envejecidos, por el contrario, muestran niveles bajos de CD62L y CXCR2, y altos de CXCR4.
3. La señalización a través de CXCR2, inducida por CXCL1, produce un fenotipo similar al envejecido en neutrófilos *ex vivo*.
4. La señalización a través de CXCR4 inducida por CXCL12 inhibe la señalización a través de CXCR2 en neutrófilos medulares y circulantes. Esta inhibición disminuye la quimiotaxis hacia CXCL1 e impide la adquisición de un fenotipo envejecido.
5. CXCL12 fluctúa de forma circadiana en plasma y frena el envejecimiento de los neutrófilos en circulación.
6. El reloj molecular se encuentra activo en los neutrófilos circulantes.
7. El proceso de envejecimiento es promovido por Bmal1 y CXCR2, y antagonizado por CXCR4. En consecuencia, neutrófilos deficientes en Bmal1 y CXCR2 muestran un fenotipo fresco y los deficientes en CXCR4 uno envejecido, tanto a nivel de receptores en superficie como a nivel transcripcional.
8. Ratones cuyos neutrófilos carecen específicamente de estos genes de manera neutrófilo-específica son útiles para investigar la participación de neutrófilos frescos y envejecidos en procesos inflamatorios.



9. Los neutrófilos frescos tienen mayor eficiencia de rodamiento, adhesión y extravasación hacia tejidos inflamados que los neutrófilos envejecidos.
10. La deficiencia en rodamiento de los neutrófilos envejecidos se debe a defectos en el citoesqueleto de actina que reducen el número de microvellosidades en superficie, los cuales son necesarios para iniciar este proceso.
11. La presencia de neutrófilos frescos en circulación empeora el infarto cerebral en un modelo experimental de ictus.
12. El proceso de envejecimiento del neutrófilo es un requisito previo para su salida homeostática de la circulación y su entrada a tejidos. Esta salida homeostática sucede de forma rítmica cuando los neutrófilos abandonan la circulación y es, al menos parcialmente, independiente de selectinas.
13. La presencia de neutrófilos envejecidos en los tejidos anticipa y tiene un efecto protector ante una infección por *Candida albicans*, pero puede comprometer la supervivencia durante un shock séptico.
14. La presencia de neutrófilos envejecidos en circulación reduce la supervivencia durante el infarto de miocardio.
15. La susceptibilidad a daño vascular en presencia de neutrófilos envejecidos se correlaciona con la formación de trombos diseminados intravasculares durante procesos de isquemia y reperfusión.

## 7. Materiales y métodos





## ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Todos los experimentos se llevaron a cabo en ratones machos en fondo genético C57BL/6 de 7 a 18 semanas de edad, con la excepción de los de daño pulmonar agudo, que se realizaron en animales BALB/c machos de 7 a 18 semanas. Los animales fueron hospedados en condiciones libres de patógenos específicos (SPF) en el animalario de la Unidad de Medicina Comparada del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC), y mantenidos bajo un régimen de 12 horas de luz y 12 de oscuridad, con agua y comida disponible *ad libitum*. Todos los experimentos se hicieron de acuerdo a los protocolos del Comité de Ética del CNIC.

En este trabajo se usaron las siguientes líneas de ratones:

Mote	Cepa	Fenotipo	Referencias
WT	C57BL/6	Animales WT	
BALB/C	BALB/C	Animales WT	
Mrp8 <sup>CRE</sup>	B6.Cg-Tg(-S100A8-cre,-EGFP)1Ilw	Recombinasa Cre bajo control del promotor de <i>Mrp8</i>	(Passequé et al. 2004)
CXCR2 <sup>fl/fl</sup>	C57BL/6-Cxcr2 <sup>tm1Rmra</sup>	Gen <i>Cxcr2</i> flanqueado por secuencias loxP	(Schloss et al. 2016)
CXCR2 <sup>ΔN</sup>	Mrp8 <sup>CRE</sup> ;CXCR2 <sup>fl/fl</sup>	Neutrófilos deficientes en <i>Cxcr2</i>	
CXCR4 <sup>fl/fl</sup>	B6.129P2-Cxcr4 <sup>tm2Yzo</sup>	Gen <i>Cxcr4</i> flanqueado por secuencias loxP	(Nie et al. 2004)
CXCR4 <sup>ΔN</sup>	Mrp8 <sup>CRE</sup> ;CXCR4 <sup>fl/fl</sup>	Neutrófilos deficientes en <i>Cxcr4</i>	
CXCR4 <sup>WHIM</sup>	Cxcr4 <sup>/1013</sup>	Mutación WHIM hiper-señalizadora de <i>Cxcr4</i>	(Balabanian et al. 2012)
Arntl <sup>fl/fl</sup>	B6.129S4(Cg)-Arntl <sup>tm1Weit</sup>	Gen <i>Arntl</i> flanqueado por secuencias loxP	(Janich et al. 2011)
Bmal1 <sup>ΔN</sup>	Mrp8 <sup>CRE</sup> ;Arntl <sup>fl/fl</sup>	Neutrófilos deficientes en <i>Arntl</i> (Bmal1)	
PEdKO	B6.129S2-Sele <sup>tm1Hyn</sup> Selp <sup>tm1Hyn</sup>	Animales doble deficientes en selectinas P y E	(Frenette et al. 1996)
DsRED	B6.Cg-Tg(CAG-Ds-Red*MST)1Nagy	Transgén DsRed bajo el promotor de beta-actina	(Vintersten et al. 2004)
LysM-GFP	B6.129P-Lyz2 <sup>tm1(E-GFP)1.1Graf/Mmmh</sup>	Expresión de eGFP en el linaje mieloide	(Faust et al. 2000)

Mote	Cepa	Fenotipo	Referencias
PEdKO-Ds-RED	PEdKO;DsRED	Animales PEdKO re- porteros DsRED	
PEdKO-LysM-GFP	PEdKO;LysM-GFP	Animales PEdKO re- porteros eGFP	
CXCL12 <sup>fl/fl</sup>	B6(FVB)-Cxcl12 <sup>tm1.1Link</sup>	Gen <i>Cxcl12</i> flanquea- do por secuencias loxP	(Greenbaum et al. 2013)
Alb <sup>CRE</sup>	B6.Cg-Tg(Alb-cre)21Mgn	Recombinasa Cre bajo el promotor de albúmina	(Postic et al. 1999)
CXCL12 <sup>ΔLV</sup>	CXCL12 <sup>fl/fl</sup> ;Alb <sup>CRE</sup>	Hepatocitos defi- cientes en <i>Cxcl12</i>	
CXCR4 <sup>ΔN</sup> - LysM-GFP	CXCR4 <sup>ΔN</sup> ;LysM-GFP	Animales CX- CR4 <sup>ΔN</sup> reporteros	
Tomato	B6.Cg-Gt(ROSA)- 26Sor <sup>tm14(CAG-tdTomato)Hze</sup>	Codón STOP en la secu- encia de tdTomato flanquea- do por secuencias loxP	(Madisen et al. 2010)
Bmal1 <sup>ΔN</sup> -To- mato	Bmal1 <sup>ΔN</sup> ;Tomato	Animales Bmal1 <sup>ΔN</sup> reporteros	
Nox2 <sup>-/-</sup>	B6.129S-Cybb <sup>tm1Din</sup>	Animales deficientes en <i>Cybb</i> , principal subunidad de la NADPH-oxidasa	(Pollock et al. 1995)

**Tabla 2:** Líneas de ratones usadas en este trabajo.

## ANÁLISIS EN HUMANOS

Se tomaron muestras de sangre de 12 voluntarios sanos a las 12:00, 16:00, 20:00, 00:00, 04:00 y 08:00 horas. A continuación lisamos los eritrocitos con una solución hipotónica (KH<sub>4</sub>Cl 0,15M; KHCO<sub>3</sub> 0,01M; EDTA 0,01M en agua milliQ). Tras lavado y centrifugado, las células se incubaron en 100μl de PBS 2mM EDTA 1% BSA (tampón PEB) con los siguientes anticuerpos: anti-CXCR4-APC (clon 12G5, eBioscience, San Diego, EEUU), anti-CD11b-FITC (ICRF44, eBioscience), anti-CD16-Pacific blue (clon 3G8, de BD Biosciences, Franklin Lakes, EEUU), anti-CD62L-PE (clon DREG56, BD Biosciences), anti-CD11c-APC y 7AAD (BD Biosciences).

Las células se analizaron en un citómetro de flujo Canto (BD) en el Hospital de la Princesa (Madrid). El estudio fue aprobado por el Comité de Ética para la Investigación Clínica del Hospital Universitario de la Princesa. Todos los participantes dieron su consentimiento informado para participar en el estudio.



## CITOMETRÍA DE FLUJO Y SEPARACIÓN CELULAR (*SORTING*)

Todos los análisis citométricos fueron realizados en un citómetro de tipo espectral Sony SP6800 (Sony Biotechnology, Tokio, Japón) o un LSRII Fortessa (BD). Las muestras humanas fueron analizadas en un citómetro Canto (BD) en el Hospital de la Princesa, y la infiltración a cerebro en el modelo de ictus en un FACSCalibur (BD) en la Universidad Complutense de Madrid. Los experimentos de separación celular (*sorting*) de neutrófilos se realizaron en un FACS Aria (BD), excepto la separación de neutrófilos de sangre del estudio de expresión circadiana, que se realizó en un SH800S (Sony). Todos los análisis, con excepción de las muestras humanas y las de infarto cerebral, se realizaron en la Unidad de Celómica del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC). El análisis final de los datos se hizo utilizando Flowjo vX (Tree Star Inc, Oregon, EEUU). Los distintos anticuerpos utilizados están tabulados en la tabla siguiente.

Anticuerpo	Clon	Especie	Compañía
CXCR4-APC	12G5	Humano	eBioscience
CD11b-FITC	ICRF44	Humano	eBioscience
CD16-Pacific Blue	3G8	Humano	BD
CD62L-PE	DREG56	Humano	BD
CD11c-APC	B-ly6	Humano	BD
Ly6G-AF647	1A8	Ratón	eBioscience
Ly6G-Dylight 450	1A8	Ratón	BioXcell (conjugado con kit de Pierce)
Ly6G-Dylight 650	1A8	Ratón	BioXcell (conjugado con kit de Pierce)
Ly6G-FITC	1A8	Ratón	eBioscience
CD45-PerCP-Cy5.5	30-F11	Ratón	Biolegend
CD11b-PE	M1/70	Ratón	Tonbo Biosciences
CD11b-FITC	M1/70	Ratón	BD
CXCR2-PerCP-Cy5.5	SA044G4	Ratón	Biolegend
CXCR4-APC	2B11	Ratón	eBioscience
CD41-PE	MWReg30	Ratón	eBioscience
Ly6C-FITC	HK1.4	Ratón	Biolegend
CD62L-APC	MEL-14	Ratón	eBioscience
CD62L-FITC	MEL-14	Ratón	eBioscience

**Tabla 3:** Tabla de anticuerpos utilizados en este trabajo para citometría de flujo.

### GENERACIÓN DE ANIMALES QUIMÉRICOS Y DE PARABIONTES

Buena parte de los experimentos de este trabajo requerían poder comparar directamente el comportamiento o el fenotipo de un neutrófilo WT los diferentes mutantes. Para minimizar variaciones experimentales y efectos extrínsecos a la célula, optamos por utilizar dos modelos que permiten la comparación dentro del mismo animal: animales quimera por trasplante de médula ósea y animales en parabiosis. La generación de animales quiméricos por trasplante de médula ósea de donantes WT y experimentales en receptores WT permite analizar ambos tipos celulares en el mismo entorno y al mismo tiempo. La generación de animales parabiontes, que conecta la circulación de dos animales de experimentación, permite observar el tráfico de neutrófilos desde un animal a la circulación y los tejidos del compañero y viceversa. Una ventaja adicional del sistema de parabiosis es que permite discriminar las células producidas localmente de la provenientes de la circulación.

### PARABIOSIS

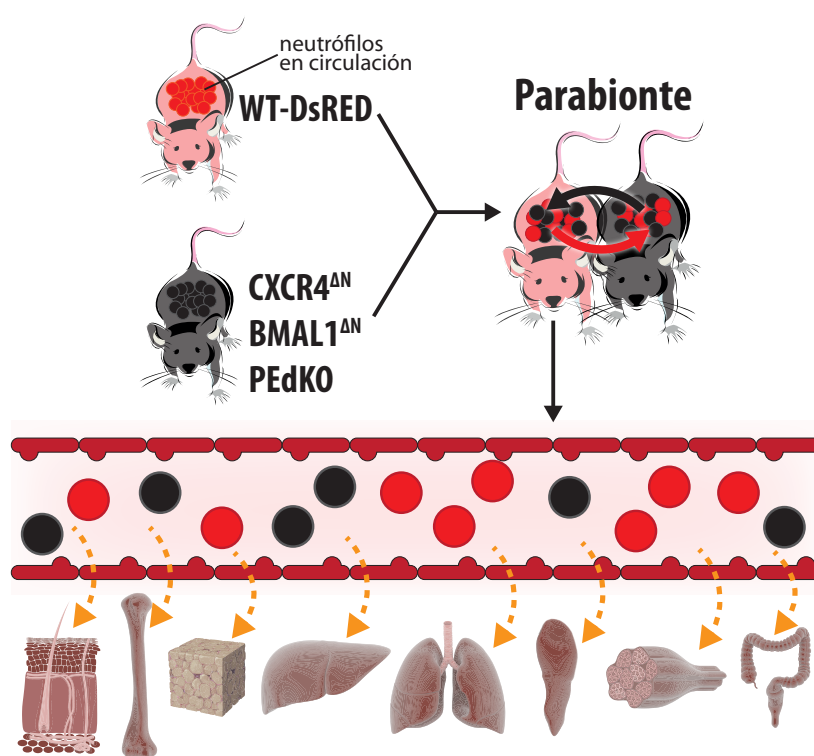
La parabiosis es un procedimiento quirúrgico que permite la unión (anastomosis) del sistema circulatorio de dos animales de experimentación, aprovechando la neoangiogénesis que se da entre los tejidos de los dos miembros de la pareja parabiótica tras la unión física de las dermis. El procedimiento se ejecutó conforme a protocolos previamente publicados ([Wright et al. 2001](#)). Para ello, los animales se anestesiaron con una mezcla de ketamina (Imalgene, de Merial Laboratorios, Madrid) al 7,5% y xilacina (Rompum, de Bayer, Leverkusen, Alemania) al 5%, inyectando intraperitonealmente 10µl/g. Se rasuraron los dorsos laterales y se ejecutó una incisión desde el olecranon hasta la rodilla. Después los olecranes y fémures se unieron utilizando una sutura simple de nylon del calibre 4 (LorcaMarín, Murcia), y la piel dorsal y ventral se unió con una sutura continua de seda del calibre 6 (LorcaMarín). Tras la cirugía, los parabiontes recibieron 0,1mg/kg de buprenorfina (Buprex de Indivior, Berkshire, Reino Unido) subcutánea y se recuperaron en cabinas de temperatura y presión de oxígeno controladas. Se esperó al menos cuatro semanas después de la cirugía para realizar los experimentos.

### GENERACIÓN DE QUIMERAS DE MÉDULA ÓSEA

Para analizar el estado de envejecimiento de neutrófilos mutantes en el mismo contexto fisiológico que las células WT generamos quimeras mixtas. Para ello se recogieron fémures de animales WT-DsRED o de los distintos modelos experimentales, se cortó la cabeza del fémur y se perfundió la médula con 1ml de PBS en condiciones de esterilidad. La médula ósea se homogeneizó suavemente por pipeteado y se contó el número de células nucleadas. Los animales WT receptores se irradiaron letalmente con dos dosis de 6Gy separadas tres horas. Los ratones irradiados se inyectaron con un millón de células nucleadas totales de la médula conteniendo un 50% de células WT-DsRED y un 50% de células del mutante a analizar. La reconstitución de la médula ósea se comprobó a las 6 semanas analizando el porcentaje de leucocitos WT-DsRED y mutantes en sangre por citometría de flujo.

## ANÁLISIS CITOMÉTRICO DE NEUTRÓFILOS EXTRAVASADOS A TEJIDOS

Para analizar los neutrófilos extravasados en distintos tejidos optamos por el modelo de parabiosis (véase el método de Parabiosis). En este modelo, la circulación de dos animales, uno WT reportero (por ejemplo, WT-DsRED) y otro mutante (por ejemplo, BMAL<sup>ΔN</sup>) se unen quirúrgicamente, de modo que los neutrófilos mutantes pueden pasar a la circulación del animal WT y desde ahí extravasarse a los tejidos (**Figura 46**). En estos experimentos analizamos el animal WT. La ventaja principal es que los neutrófilos mutantes se producen en el ratón compañero y, por tanto, todos los neutrófilos mutantes que encontremos en tejidos del animal WT solo pueden originarse por extravasación a partir de la circulación. Esta es la definición usada en este trabajo para un neutrófilo que ha sufrido el proceso de *clearance* de circulación. Esta aproximación permite evitar posibles confusiones provocadas por neutrófilos generados en un tejido. Por ejemplo, en el bazo o la médula ósea se producen neutrófilos y, por tanto, sin la técnica de parabiosis no sería posible diferenciar los neutrófilos que se han extravasado de los producidos en ese órgano.



**Figura 46:** Parabiosis para el análisis de neutrófilos extravasados en distintos tejidos.

## ANÁLISIS DEL TRÁFICO DE NEUTRÓFILOS EN HOMEOSTASIS

Se prepararon parejas de parabiontes reporteros WT-DsRED con animales sin marca fluorescente CXCR2<sup>ΔN</sup>, BMAL<sup>ΔN</sup>, CXCR4<sup>ΔN</sup>, PEdKO o animales WT como control. Todos los tejidos se extrajeron en el compañero WT, y su sangre se analizó para obtener la proporción de neutrófilos procedente de cada miembro de la pareja en circulación.

Los animales se sacrificaron con CO<sub>2</sub> y fueron perfundidos con 30ml de PBS para eliminar toda traza de sangre. Se extrajo grasa blanca epididimal, intestino grueso (colon), hígado, pulmón, piel y bazo y se mantuvieron (excepto el hígado) en PBS en hielo hasta comenzar el procesado, que se realizó inmediatamente después de extraer todos los tejidos. El hígado se mantuvo a temperatura ambiente en HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*, GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido) hasta su procesado.

La piel, pulmón y grasa fueron digeridos en HBSS con 1U/ml liberasa (Roche, Basilea, Suiza) y 1mU/ml DNasa I (Sigma-Aldrich, San Luis, EEUU) a 37°C durante 30 minutos. El intestino grueso se pre-incubó con HBSS 5mM EDTA a 37°C durante 45 minutos para eliminar las células epiteliales y después se digirió de la misma manera. El bazo fue mecánicamente disgregado pasándolo por un tamiz de 100µm (BD). Para enriquecer la muestra de hígado en leucocitos éste se disgregó pasándolo por un filtro de 100µm y centrifugó en gradiente de Percoll al 36% en HBSS. Las muestras de sangre fueron divididas en dos partes, una fue analizada en un contador hematológico Abacus Junior (Diatron, Budapest, Hungría) y la otra fue preparada para citometría. Para ello se lisaron los eritrocitos en un tampón hipotónico (KH<sub>4</sub>Cl 0.15M; KHCO<sub>3</sub> 0.01M; EDTA 0.01M en agua milliQ). Finalmente, todas las suspensiones de células disgregadas se marcaron con anticuerpos conjugados para su análisis por citometría de flujo. Se usaron anticuerpos conjugados contra CD45-PerCP-Cy5.5, CD11b-FITC y Ly6G-Dylight 650 (**Tabla 3**).

La fluorescencia de la proteína DsRED permitió diferenciar las células del huésped WT y las del parabionte compañero. Para normalizar los valores entre las distintas parejas de parabiontes se corrigieron las proporciones entre neutrófilos de uno y otro miembro de la pareja por la proporción que mostraban en sangre. De este modo, las desviaciones que encontramos en los tejidos respecto a las proporciones en sangre se utilizaron para estimar la eficiencia de infiltración hacia los tejidos de cada tipo de neutrófilos usando la siguiente fórmula: proporción de neutrófilos del compañero en el tejido / proporción de neutrófilos del compañero en sangre.

Finalmente, las eficiencias de infiltración se normalizaron respecto a los valores obtenidos en las parejas control WT-DsRED:WT.

## CUANTIFICACIÓN DEL NÚMERO DE NEUTRÓFILOS EN TEJIDO

En algunos experimentos de tráfico de neutrófilos a tejidos (véase método anterior) se cuantificó el número absoluto de neutrófilos utilizando microesferas de conteo True-count absolute counting tubes (BD). Las microesferas se prepararon a una concentración de 10000 por mililitro, y se añadieron 300µl de la suspensión a las células marcadas justo antes de pasar por el citómetro. El número de neutrófilos se calculó en base al número de microesferas en cada tubo y se corrigió por el peso o volumen de cada órgano analizado.

## ANÁLISIS GENÉTICOS

Hemos realizado dos tipos principales de análisis genéticos, PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) para estudiar la transcripción de genes concretos a distintos tiempos en ani-

males WT; y secuenciación masiva de ARN, que nos permite obtener información global sin seleccionar los genes de antemano y, por tanto, permite un análisis no sesgado. Esta última también nos ha permitido identificar las rutas bioquímicas que están activas en unos y otros neutrófilos.

## EXTRACCIÓN DE ARN Y PCR CUANTITATIVA

Para analizar los ARNs mensajeros de los genes de interés en neutrófilos se extrajo el ARN de neutrófilos sorteados utilizando el kit RNeasy Plus Mini (Quiagen, Hilden, Alemania) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El ADNc fue transcrito usando el kit High-Capacity cDNA reverse transcription (Applied Biosystems, Foster City, EEUU), también de acuerdo al protocolo del fabricante. Los análisis de PCR cuantitativa en tiempo real se realizaron con un detector 7900HT (Applied Biosystems) y la expresión fue normalizada al gen de referencia *36b4*. Los cebadores utilizados se encuentran en la **Tabla 4**.

Gen	Tipo de iniciador	Secuencia
Csf3r	Hacia delante	CTGATCTTCTTGCTACTCCCCA
	Reverso	GGTGTAAGTTCAAGTGAGGCAG
Il1b	Hacia delante	AGTGAGGAGAATGACCTGTTC
	Reverso	CGAGATGCTGCTGTGAGATT
Sell	Hacia delante	TACATTGCCCAAAGCCCTTAT
	Reverso	CATCGTTCCATTTCCCAGAGTC
CXCR4	Hacia delante	TCAGTGGCTGACCTCCTCTT
	Reverso	CTTGGCCTTTGACTGTTGGT
Mcl1	Hacia delante	AAAGGCGGCTGCATAAGTC
	Reverso	TGGCGGTATAGGTCGTCCTC
CXCR2	Hacia delante	TCTGGCATGCCCTCTATTCTG
	Reverso	AAGGTAACCTCCTTCACGTAT
Arntl	Hacia delante	AGAGGCGTCGGGACAAAATGAACAG
	Reverso	AACAGCCATCCTTAGCACGGTGA
Clock	Hacia delante	CCTATCCTACCTTGGCCACACA
	Reverso	TCCCGTGGAGCAACCTAGAT
Per2	Hacia delante	CCATCCACAAGAAGATCCTAC
	Reverso	GCTCCACGGGTTGATGAAGC
Nr1d1	Hacia delante	CTTCATCCTCCTCCTCCTTCTA
	Reverso	GTAATGTTGCTTGTGCCCTTG



Gen	Tipo de iniciador	Secuencia
36b4	Hacia delante	ACTGGTCTAGGACCCGAGAAG
	Reverso	TCCCACCTTGTCTCCAGTCT

**Tabla 4:** Cebadores utilizados para análisis de PCR en tiempo real.

## SECUENCIACIÓN DE ARN Y ANÁLISIS DE DATOS

Para la extracción de ARN se purificaron neutrófilos de sangre Ly6G+ DAPI- con técnicas citométricas de separación (*FACS sorting*), obteniendo purezas superiores al 95%. Los experimentos de secuenciación se realizaron en la Unidad de Genómica del CNIC. La amplificación del ARN y la generación de librerías de secuenciación se realizaron usando el sistema Ovation Single Cell RNAseq (NuGen Technologies, San Carlos, EEUU). Las librerías se cuantificaron usando un ensayo Quant-iT™ dsDNA HS con un fluorómetro Q-bit (Life Technologies, Carlsbad, Alemania), y su tamaño determinado en un Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, EEUU). Se generaron lecturas de 61 nucleótidos en un Genome Analyzer Ix usando el kit TruSeq SBS v5 (Illumina, San Diego, EEUU) siguiendo protocolos estándar de secuenciación de ARN. Las lecturas se procesaron con el paquete CASAVA (Illumina) para producir ficheros fastq. La calidad de las lecturas se determinó con la aplicación FastQC, se eliminaron contaminaciones de los adaptadores de secuenciación con Cutadapt y los resultados se acoplaron en el transcriptoma (GRCm38 Ensembl gene-build 70) y se cuantificaron con RSEM 1.17. Para el análisis solo se consideraron los genes con al menos una cuenta por millón en al menos dos muestras. Los datos se normalizaron y testaron para expresión diferencial con el paquete Bioconductor EdgeR. Los p-valores no ajustados se utilizaron para identificar rutas bioquímicas utilizando Ingenuity Pathway Analysis (IPA, Qiagen, Hilden, Alemania). Los análisis de agrupamiento (*k-means clustering*), análisis de componentes principales y los heat-maps se hicieron utilizando el software Genesis (TU Graz).

Los datos crudos de la secuenciación se encuentran disponibles públicamente en el repositorio Gene Expression Omnibus (GEO) del NIH (*National Institutes of Health*) con el número de acceso: GSE86619.

## ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

Entre los análisis de proteínas que hemos realizado para este trabajo se encuentran las cuantificaciones por ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) de varias quimioquinas presentes en plasma de ratones obtenido intervalos de 4 horas, durante 24 horas. También los análisis citométricos para la caracterización de marcadores de superficie en los distintos experimentos, como se describió anteriormente. Por último, hemos utilizado técnicas de electrotransferencia o *Western Blot* para corroborar la eliminación de proteínas de interés en nuestros ratones mutantes.

## CUANTIFICACIÓN DE QUIMIOQUINAS EN PLASMA

Se analizaron los niveles de CXCL12 y CXCL1 en plasma extraído de animales WT cada 4 horas durante 24 horas. Para ello se obtuvo sangre en tubos recubiertos con EDTA y se centrifugó durante 10 minutos a 300g a 4°C. Finalmente el plasma sobrenadante se diluyó 1:2 en PBS antes de utilizarlo.

Para el análisis se utilizaron kits de ELISA comerciales para CXCL12 (MAB350/BAF310) y CXCL1 (MAB275R/BAF275, ambos de R&D Systems, Minneapolis, EEUU). Placas de 96 pocillos se recubrieron con el anticuerpo monoclonal en tampón de unión ( $\text{NaHCO}_3$  0,1M en agua milliQ ajustado a pH=8,6-8,9) durante una noche a 4°C. Posteriormente se bloqueó durante 1h con tampón de bloqueo (PBS 1% albúmina de suero bovino y 5% sucrosa) y se incubó el plasma durante 2h a temperatura ambiente. Posteriormente se incubó 2h a temperatura ambiente con los anticuerpos biotinilados correspondientes y finalmente con una estreptavidina-HRP (peroxidasa del rábano) a 1µg/ml durante 2h. Se reveló con el sustrato de la HRP, TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina, Sigma) y se detuvo la reacción con HCl 1M. La lectura colorimétrica se realizó en un lector de placas xMark Microplate Spectrophotometer (BioRad) a 450nm. Simultáneamente se hicieron rectas patrón con la quimioquina recombinante correspondiente (Peprotech) para interpolar los resultados de colorimetría.

## ANÁLISIS CIRCADIANO DE MARCADORES EN NEUTRÓFILOS

Se tomaron muestras de sangre circadianas cada 4 horas durante 24 horas de animales WT o experimentales y se analizaron por citometría de flujo con los anticuerpos Ly6G-DyLight 450, CXCR2-PerCP-Cy5.5 y CXCR4-APC (véase la **Tabla 3**). Las células se resuspendieron en PEB con DAPI (1:10000) para el análisis citométrico.

## WESTERN BLOT

Se sortearon neutrófilos de sangre y se lisaron en tampón RIPA 50mM Tris-HCl, pH 8; 150mM NaCl; 1% Triton X100; 0.5% deoxicolato sódico; 0.1% SDS; 1mM PMSF (Sigma) en presencia de un cocktail inhibidor de proteasas (Sigma). Las proteínas totales de  $2 \times 10^5$  células se separaron en por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y se transfirieron a una membrana de PVDF (polifluoruro de vinilideno). Las membranas se incubaron durante una noche con anticuerpos contra Bmal1 (Bethyl labs, Montgomery, EEUU) diluido 1:200 y beta-actina (Abcam, Cambridge, Reino Unido) diluido 1:500 en PBS. Posteriormente se lavaron 3 veces en PBS durante media hora en agitación y se incubaron durante 1h a temperatura ambiente con anticuerpos secundarios conjugados con HRP (GE Healthcare) diluidos 1:500 en PBS. El resultado se visualizó con el sustrato quimioluminiscente Luminata Forte HRP Substrate (Millipore, Billerica, EEUU). La captura de imagen se realizó en un lector de quimioluminiscencia LAS 4000 mini (GE Healthcare) con una exposición de 60 segundos.

## MICROSCOPIA

Las técnicas de microscopía utilizadas para este trabajo pertenecen a cuatro categorías: microscopía intravital, microscopía confocal *whole mount* o en corte fino, microscopía SPIM o de lámina de luz (*light sheet microscopy*) y microscopía electrónica de barrido.

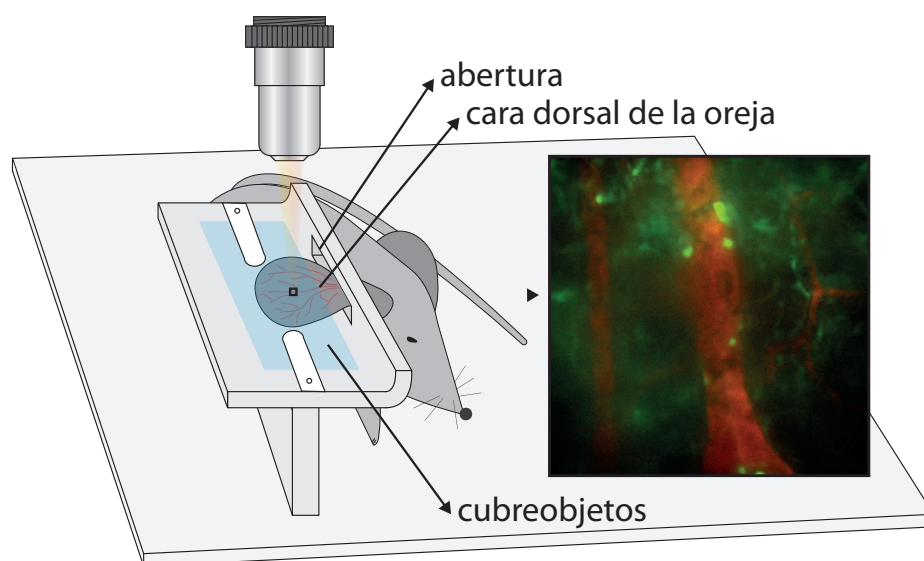
La microscopía intravital permite la observación directa del comportamiento de células en su entorno fisiológico *in vivo*, tanto dentro de los vasos como extravasados en tejido (Jain et al. 2016), y nos ha servido para analizar el comportamiento de los neutrófilos tanto en homeostasis como en inflamación. El análisis en homeostasis se realizó en la microvasculatura de la piel para evitar daño inflamatorio o trauma, mientras que los de inflamación se realizaron en la microvasculatura del músculo cremaster tratado con TNF $\alpha$ .

La microscopía confocal nos ha permitido analizar estas células con mayor resolución en regiones más amplias, por ejemplo para cuantificar la extravasación de los neutrófilos a tejidos en distintos modelos, tanto en homeostasis como en inflamación.

Por último las técnicas de transparentado de tejidos para microscopía SPIM nos ha permitido corroborar la presencia de neutrófilos en los tejidos y su situación en los mismos con mayor resolución espacial. Esto es posible porque permite capturar fragmentos mucho más grandes de tejido que los posibles en microscopía confocal tradicional (Richardson & Lichtman 2015).

## MICROSCOPIA INTRAVITAL DE LA PIEL

Para analizar el comportamiento *in vivo* de los neutrófilos en condiciones homeostáticas realizamos experimentos de microscopía intravital en la microcirculación dermal de la oreja de los ratones. Para ello se montó la cara dorsal de la oreja en un soporte construido *ad hoc* (véase la **Figura 47**), y se capturaron vídeos de lapso de tiempo (*time lapse*) durante 2 minutos con intervalos de 3 segundos. Se utilizó el sistema VIVO (3i - Intelligent Imaging Innovations, Göttingen, Alemania) montado sobre un microscopio Axio Examiner Z.1 (Zeiss, Oberkochen, Alemania) con una plataforma motorizada (Sutter Instrument, Novato, EEUU). Para la captura se utilizó una lámpara de fluorescencia CoolLED pE widefield fluorescence (CoolLED Ltd, Andover, Reino Unido) y un filtro dicróico Di01-R405/488/561/635 y emisor FF01- 446/523/600/677 (Semrock, Rochester, EEUU). Se utilizó un objetivo 40x/1.0 W de inmersión (Zeiss) y una cámara CoolSnap HQ2 (Photometrics, Tucson, EEUU). El software de captura fue SlideBook versión 6 (3i). Las adquisiciones se hicieron a ZT5, ZT9 o ZT13. Los animales se anestesiaron con una mezcla de ketamina al 7,5% y xilacina al 5%, inyectando intraperitonealmente 10  $\mu$ l/g. Los neutrófilos fueron marcados con un anticuerpo contra Ly6G conjugado con AF (Alexa Fluor) 647. Los vasos se visualizaron gracias a la inyección de dextrano marcado con rodamina (Molecular Probes, Eugene, EEUU). En algunos grupos se inyectaron anticuerpos bloqueantes contra Selectinas P y E o un anticuerpo control anti-RatIgG dos horas antes de la captura de imágenes, todos a 25  $\mu$ g por ratón. La cuantificación se realizó con FIJI (Schindelin et al. 2012), una distribución de ImageJ (NIH) y las células se consideraron adheridas si permanecían más de 30 segundos en la misma posición. El número de células adherentes se normalizó por el diámetro del vaso.



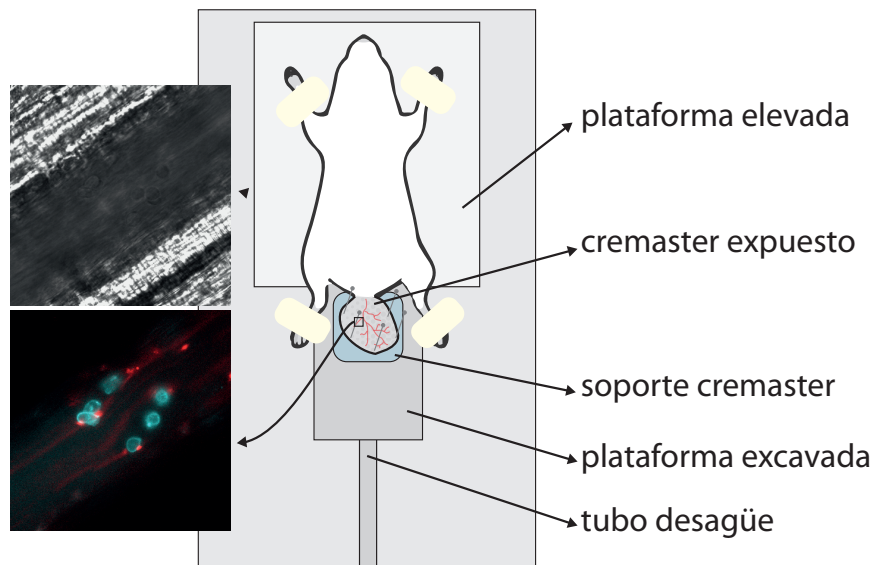
**Figura 47: Esquema de la plataforma para microscopía intravital de piel.** La cara dorsal de la oreja se coloca sobre el soporte a través de la abertura. Se humedece la oreja con agua y se coloca encima un cubreobjetos, a través del cual se harán las capturas.

## MICROSCOPIA INTRAVITAL DEL MÚSCULO CREMASTER

Para visualizar el comportamiento en condiciones inflamatorias de los neutrófilos se realizaron experimentos de microscopía intravital en la microcirculación del músculo cremaster siguiendo protocolos publicados (Hidalgo et al. 2009). Esencialmente, se inyectaron 0,5µg de TNFα por vía intraescrotal 2 horas antes de la captura. Los animales se anestesiaron con una mezcla de ketamina al 7,5% y xilacina al 5%, inyectando intraperitonealmente 10µl/g. Se expuso el músculo cremaster y se montó sobre una plataforma transparente diseñada *ad hoc* (véase la Figura 48). Una vez exteriorizado el músculo, se inyectó vía intravenosa 1µg de anticuerpo contra Ly6G conjugado con AF647 (Tabla 3) para visualizar neutrófilos. El sistema de microscopía intravital se ha descrito en el apartado anterior. Para la captura de imágenes confocales se utilizaron líneas laser de 488, 561 y 640nm acopladas a un escáner confocal CSUX-A1 (Yokogawa, Tokio, Japón) y se capturaron imágenes con intervalo en Z de 0,5µm. Se capturaron de diez a veinte vénulas por animal 150 a 210 minutos tras la administración del TNFα. Las capturas fueron de 2 minutos a intervalo de 3 segundos en cada campo.

Para analizar el número de células rodando (*rolling*) o adheridas se utilizó el software SlideBook (3i), y se normalizó su número al diámetro del vaso en el que se encontraban para permitir la comparación de todos los campos. Este dato se comparó con la frecuencia de células WT o experimentales en cada ratón o pareja de parabiontes obtenida por citometría de flujo, lo que permitió calcular el índice de adhesión o de rodamiento. Los parámetros cinéticos de los neutrófilos sobre el endotelio vascular (velocidad, direccionalidad, distancia acumulada y distancia euclidiana) se calcularon usando la extensión Manual Tracking (Fabrice Cordelières, Institut Curie) y la herramienta Chemotaxis and Migration Tool (Ibidi, Martinsried, Alemania) ambos corriendo sobre FIJI (Schindelin et al. 2012), una distribución de ImageJ (Schindelin et al. 2015). Los parámetros cinéticos de neutrófilos

extravasados en los parabiontes WT-DsRED:PEdKO-LysM-GFP se obtuvieron utilizando métodos de tracking automatizados con el software Imaris (Bitplane, Zurich, Suiza).



**Figura 48: Plataforma para la microscopía intravital del músculo cremaster.** Todos los componentes son de metacrilato transparente. El animal se coloca sobre la plataforma elevada, y el cremaster expuesto se coloca sobre su soporte y se inmoviliza con alfileres. La captura se realiza en la zona central del soporte del cremaster. El flujo de tampón sobre el cremaster durante la captura se recoge en la plataforma excavada y se elimina gracias al vacío que se conecta al tubo de desagüe.

## MICROSCOPIA INTRAVITAL DURANTE ISQUEMIA/REPERFUSIÓN

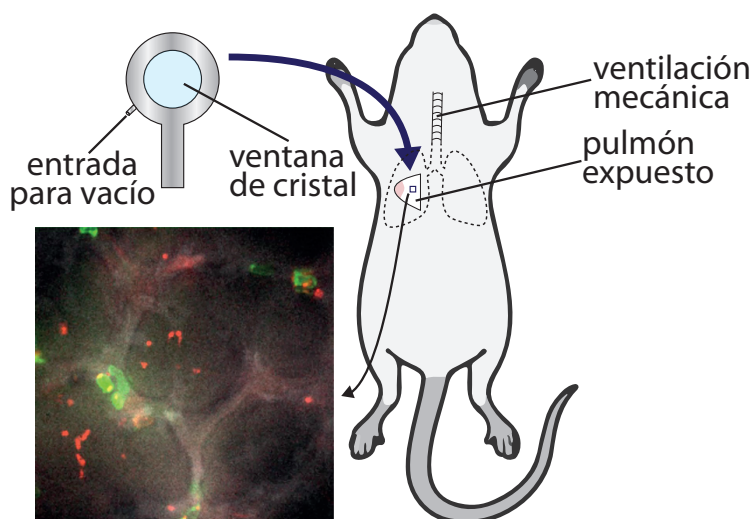
Para visualizar la respuesta de los neutrófilos en caso de isquemia y posterior reperfusión utilizamos la microvasculatura del cremaster. Los músculos cremaster fueron preparados como se ha especificado, pero sin inyección de TNF $\alpha$  previa. La isquemia se consiguió ocluyendo los vasos aferentes y eferentes con una abrazadera (*clamp*) Micro Serrefine (Fine Science Tools, Foster City, EEUU) durante 45 minutos. La reperfusión se realizó eliminando la obstrucción al retirar la abrazadera. Para visualizar los leucocitos se inyectó vía intravenosa 1 $\mu$ g de anticuerpo contra Ly6G-APC para marcar neutrófilos y contra CD41-PE para marcar plaquetas. En animales en los que se eliminó la población de neutrófilos en circulación utilizando anti-Ly6G purificado (BioXcell, West Lebanon, EEUU), se utilizaron anticuerpos anti-Ly6C-FITC (Biolegend) y anti-CD62L-APC (BD) para el marcaje de leucocitos. Se capturaron imágenes, antes, durante y después de la isquemia.

## MICROSCOPIA INTRAVITAL DE PULMÓN

Para la microscopía intravital de pulmón se siguió un método publicado anteriormente (Looney et al. 2011). En resumen, los animales fueron anestesiados con ketamina y xilacina, y se les practicó una traqueotomía para insertar un tubo de ventilación artificial (Small



Animal Ventilator, Numio tecnologías). El animal fue ventilado con 100% de O<sub>2</sub>. Tras toracotomía lateral izquierda se colocó una ventana (**Figura 49**) acoplada a un sistema de vacío (4 cm H<sub>2</sub>O) que recupera la presión en la cavidad torácica e inmoviliza el pulmón. La toma de imágenes se realizó en el sistema VIVO descrito anteriormente. Se capturaron 4 a 5 campos por ratón, con una apnea temporal de 5 segundos durante la captura. El análisis se realizó con ImageJ, cuantificando el número de neutrófilos adheridos en la vasculatura pulmonar.



**Figura 49: Esquema de la preparación para microscopía intravital de pulmón.** El animal se mantiene anestesiado y con ventilación mecánica a través de la tráquea. Se expone un lóbulo pulmonar izquierdo y se coloca una ventana con un cubreobjetos de cristal (izquierda), que está acoplada a una bomba de vacío que inmoviliza el pulmón y recupera la presión en la cavidad torácica.

## INMUNOTINCIÓN Y ANÁLISIS DE TEJIDO COMPLETO (WHOLE MOUNT) DEL MÚSCULO CREMASTER

Para hacer la inmunitinción de tejido completo (*whole mount*) los músculos cremaster escindidos se fijaron durante una noche en paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS. Al día siguiente, las muestras fueron lavadas 3 veces en PBS 0.5% Triton X100 (PBST) y bloqueadas durante 2 horas en PBST conteniendo un 25% de FBS (sueno bovino fetal) a temperatura ambiente y en agitación. El marcaje de los neutrófilos se hizo con un anticuerpo contra Mrp14 (clon 2B10, cortesía de la Dra. Nancy Hogg, Cancer Research UK) biotinilado con un kit comercial (Pierce – Thermo Fisher, Waltham, EEUU), y el de la vasculatura con un anticuerpo primario anti-CD31 (realizado en conejo, clon MEC 13.3, BD) en PBST 10% FBS durante una noche, a 4°C en agitación. Tras la incubación con anticuerpos se lavaron los músculos marcados con PBS 3 veces durante 1h a temperatura ambiente (RT) y se incubó con los anticuerpos secundarios (cabra anti-conejo-Alexa 405 o -Alexa 647, de Life Technologies) y con una estreptavidina conjugada con Alexa 488 (eBioscience) durante 4 horas a temperatura ambiente y en agitación. Finalmente las muestras se lavaron 3 veces durante 1 hora en PBS y se montaron con Mowiol 4-88 (Mw 31000, Sigma).

La captura de imagen se realizó en la Unidad de Microscopía del CNIC utilizando un sistema confocal Leica SP8 X acoplado a un microscopio invertido DMI6000 con un objetivo 10x (HC PL Flotar 10x/0,3 seco) o un 63x (HC PL Apo CS2 63x/1.4 de inmersión en aceite). Para la cuantificación absoluta de neutrófilos extravasados se capturaron imágenes Z-stack con cosido panorámico (*stitching*) de todo el tejido con un sistema confocal Nikon A1R acoplado a un microscopio invertido Nikon Eclipse-TI, utilizando un objetivo 10x/0,45 seco. La cuantificación se hizo de manera ciega y automatizada utilizando Imaris. Se contaron los neutrófilos extravasados tras enmascarar los vasos utilizando la fluorescencia de los anticuerpos contra CD31 en los experimentos con quimeras WT:Bmal<sup>ΔN</sup> o WT:CXCR4<sup>ΔN</sup> y parabiontes PEdKO:Bmal<sup>ΔN</sup>, o delineando manualmente los vasos a partir de la imagen de campo claro o tinción con laminina (policlonal, Sigma) en los experimentos con parabiontes WT:PEdKO.

### INMUNOTINCIÓN DE CORTES FINOS

Para visualizar los neutrófilos en tejidos se realizaron inmunotinciones de fluorescencia en cortes finos. Para ello, los tejidos fijados en PFA al 4% se embebieron en OCT y cortaron en secciones finas de 5 μm en un criostato LM1850 (Leica, Wetzlar, Alemania). Se incubaron 1h a temperatura ambiente en tampón de bloqueo (PBS 10% BSA, 2% suero de cabra) y se incubaron con anticuerpos. Para los análisis en pulmón se marcaron 1h a temperatura ambiente con anticuerpos contra laminina (conejo-anti-ratón, Sigma) en tampón de bloqueo diluido 1:2 en PBS. A continuación los tejidos se lavaron e incubaron con un anticuerpo secundario cabra-anti-conejo conjugado con AF488 (Molecular Probes), y con anticuerpos conjugados contra Ly6G-APC (Bioxcell) y contra CD41-PE (eBiosciences). Finalmente, tras tres lavados con PBS, las muestras se montaron con Mowiol 4-88. Para los análisis de neutrófilos en tejidos procedentes de animales reportero LysM-GFP se marcó la lámina basal con anticuerpos anti-laminina y los neutrófilos con anticuerpos anti-Ly6G.

### TRANSPARENTADO CON BABB DE TEJIDOS COMPLETOS

Para visualizar los neutrófilos en los tejidos se realizaron inmunotinciones de órganos enteros y transparentados (*tissue clearing*). Ésta técnica permite reducir la difracción de la luz en el interior de los tejidos y con ello permite analizar por microscopía tejidos enteros sin necesidad de recurrir a cortes finos, con lo que la información anatómica y de contexto que se obtiene es mucho mayor. Se realizó siguiendo protocolos anteriormente publicados ([Alanentalo et al. 2007](#)). Los animales fueron sacrificados en cabinas de CO<sub>2</sub> y posteriormente perfundidos con 30ml de PBS para eliminar las células de circulación. Los tejidos se fijaron en PBS conteniendo 4% PFA y un 30% sacarosa durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras lavar las muestras, éstas se permeabilizaron en gradientes de metanol en PBS durante 30 minutos por paso: 50%, 80% y 100% (se indica el porcentaje de metanol en PBS) posteriormente se incubó 30 minutos en metanol con un 20% de DMSO y luego se rehidrató también durante 30 minutos por paso con metanol en PBS: 80%, 50%, 30% (se indica el porcentaje de metanol en PBS). Finalmente se incubó 30 minutos en PBS y

se bloquearon los tejidos durante una noche en agitación a 4°C. Posteriormente se marcó durante 48h con anticuerpos primarios contra CD31 (para visualizar la vasculatura, generado en hámster armenio, clon 2H8, Invitrogen) y Mrp14 (para visualizar los neutrófilos, generado en conejo, clon 2B10, Abcam) a 4°C en agitación. Tras los lavados se marcó durante una noche con anticuerpos secundarios (anti-conejo AF488 y anti-hamster AF568, ambos de Abcam) y tras la incubación se lavaron las muestras en PBS conteniendo 0.2% Triton X-100 y un 3% de NaCl. Finalmente se procedió a la transparentización del tejido con BABB (*benzyl alcohol* y *benzyl benzoate* en proporción 1:2), para lo que se pasaron las muestras a recipientes de cristal y se procedió a su deshidratación en gradientes de metanol en agua destilada, 30 minutos por paso: 50%, 70%, 95%, (el se indica el porcentaje de metanol en agua destilada) y tres incubaciones en metanol 100%. Por último se incubaron durante 30 minutos en una mezcla de metanol y BABB al 50%, y otros 30 minutos en BABB 100%. La captura se realizó en un microscopio de tipo SPIM (UltraMicroscope, LaVision Biotec, Bielefeld, Alemania). La microscopía SPIM (de *Selective Plane Illumination Microscopy*) utiliza una lámina de luz para iluminar la muestra y permite capturar imágenes con resolución celular de un tejido completo (Lim et al. 2014). La preparación y captura de estas muestras se realizó en los laboratorios del Singapore Immunology Network (SIgN) durante una estancia breve en el laboratorio del Dr. Lai Guan Ng.

## MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)

Extrajimos sangre de animales CXCR4<sup>ΔN</sup>, BMAL<sup>ΔN</sup>, PEdKO y WT a ZT5, se lisaron los eritrocitos y se purificaron los neutrófilos por separación celular como se ha descrito anteriormente. Las células aisladas fueron fijadas con 4% PFA 2.5% glutaraldehído en PBS durante 2 horas a 4°C. Las células fijadas se deshidrataron con incubaciones seriadas de 5 minutos en gradientes de etanol (30%>50%>70%>80%>90%>100%, se indica el porcentaje de etanol en agua destilada). Las muestras se deshidrataron completamente en un secador de punto crítico automático (Leica EM CDP 300) y se recubrieron con sales de metales pesados en un sistema de recubrimiento Q150RS (Quorum Technologies, Lewes, Reino Unido). La captura de imagen fue realizada a 10kV con un microscopio electrónico de escaneo 6335F (Jeol, Akishima, Japón). El secado de punto crítico, recubrimiento y toma de imágenes se realizó en el Centro Nacional de Microscopía Electrónica de la Universidad Complutense de Madrid.

## MODELOS DE ENFERMEDAD

Para analizar la función de los neutrófilos frescos y envejecidos hemos utilizado varios modelos de enfermedad con relevancia clínica, tratando de buscar los más útiles para testar nuestra hipótesis de trabajo, incluyendo infarto de miocardio, ictus cerebral, daño pulmonar agudo o sepsis por perforación del ciego. También hemos utilizado modelos de inflamación estéril, incluyendo la peritonitis inducida por zimosan, que es una molécula procedente de la superficie de diversos hongos patógenos que induce una inflamación experimental bien definida (Cash et al. 2009).

### MODELO DE PERITONITIS INDUCIDA POR ZIMOSAN

Animales quiméricos por trasplante de médula ósea fueron tratados con 1mg de zimosan (Sigma) por vía intraperitoneal. Se tomaron adicionalmente muestras de sangre para analizar la proporción de células WT o experimentales en circulación. Dos horas después realizamos un lavado peritoneal en los animales sacrificados para análisis citométricos de los neutrófilos infiltrados. Comparamos la proporción de neutrófilos procedentes de cada donante en el peritoneo y la sangre para estimar la eficiencia de migración de los neutrófilos WT o mutantes con la fórmula: eficiencia = proporción en peritoneo/proporción en sangre. También se comparó la eficiencia de infiltración de neutrófilos WT a distintos tiempos (ZT5 y ZT13). En este caso, analizamos el número absoluto de neutrófilos infiltrados con microesferas de conteo, como se ha indicado anteriormente y analizamos la migración relativa al número de neutrófilos en circulación.

### INFECCIÓN CON *CANDIDA ALBICANS*

Los animales indicados en cada experimento fueron infectados con  $1.5 \times 10^5$  conidias de *C. albicans* (cepa SC5314) por vía intravenosa a ZT5 o ZT13. Se monitorizaron diariamente para verificar pérdidas de peso y estado general de salud siguiendo la guía del servicio de bienestar animal. Seis días después de la inoculación se analizó la carga fúngica en el riñón sembrando diluciones seriadas del homogeneizado del riñón en placas YPC (placas de cultivo sólido con 5g/L de extracto de levadura, 10g/L peptona y 3g/L celobiosa, Sigma). Las unidades formadoras de colonias (CFUs) se contaron tras 48h a 30°C. El análisis de neutrófilos infiltrados en el riñón se realizó por citometría de flujo como se ha descrito anteriormente.

### MODELO DE INFARTO DE MIOCARDIO

Ratones macho de 8 a 12 semanas se sometieron a 45 minutos de oclusión de la arteria coronaria anterior descendente izquierda (LAD) seguidos de 24 horas de perfusión. El procedimiento de isquemia y perfusión se realizó siguiendo protocolos previamente establecidos ([García-Prieto et al. 2014](#)). En algunos experimentos los ratones fueron sujetos a eliminación de neutrófilos circulantes (véase protocolo de eliminación de neutrófilos *in vivo*). Los animales fueron anestesiados con una mezcla de ketamina 10%, xilacina 5% y atropina 10% en suero salino, fueron entubados, y su temperatura controlada a 36.5°C para evitar la cardioprotección por hipotermia. Se realizó una toracotomía y se anudó la LAD con una sutura de nylon monofilamento del calibre 8 durante 45 minutos. En este tiempo, se controló el electrocardiograma para confirmar la oclusión total de la LAD (MP36R, Biopac Systems Inc). Tras 45 minutos se liberó la arteria, se cerró el tórax y se mantuvieron los animales durante 24h en recuperación con oxígeno 100% y analgesia con buprenorfina subcutánea 0.1mg/kg. Para la cuantificación del tamaño de infarto los animales se volvieron a anestesiarse y entubar, y la LAD se volvió a ocluir ligando la sutura en su posición original. Se sacrificaron los animales y se inyectó Evans Blue (Sigma) intravenoso para delinear el área en riesgo (AAR), es decir, la zona del miocardio sin flujo de sangre. Después se aisló

el ventrículo izquierdo, se cortó en rodajas de 1mm y se tomaron imágenes de ambas caras para cuantificar el AAR. Para visualizar el miocardio infartado (necrótico), las rodajas se incubaron con cloruro de trifeniltetrazolio 1:10 en PBS (TTC, Sigma) a 37°C durante 15 minutos, y se volvieron a fotografiar las rodajas y se pesaron. Las regiones negativas para Evans Blue (AAR) y positivas para TTC (área infartada) se cuantificaron usando ImageJ. Finalmente los porcentajes de AAR y miocardio infartado fueron corregidos por peso para cada rodaja y el valor absoluto se determinó como el ratio mg:mg de AAR respecto al ventrículo izquierdo, y el peso de la zona infartada respecto al AAR.

## MODELO DE ICTUS CEREBRAL AGUDO

Para inducir isquemia cerebral sin perfusión, seguimos protocolos previamente descritos ([Sreeramkumar et al. 2014](#)). Los animales fueron anestesiados con 1.2-2% isofluorano en una mezcla de aire 80% y oxígeno 20%, y se mantuvo la temperatura controlada durante el procedimiento y la recuperación de la anestesia. Se realizó una oclusión permanente de la arteria cerebral media (pMCAO) por oclusión distal de la arteria con una sutura del calibre 9, justo antes de su bifurcación entre las ramas frontal y parietal, en combinación con sutura de la arteria carótida común ipsilateral. El tamaño de infarto fue cuantificado por resonancia magnética 48 horas tras la cirugía con un equipo Biospec BMT 47/40 (Bruker, Billerica, EEUU). El volumen de infarto se calculó usando ImageJ a partir de las capturas T2. Las áreas de tejido infartado, la del hemisferio ipsilateral y la del hemisferio contralateral se cuantificaron para cada imagen. Posteriormente, el volumen de infarto se calculó como porcentaje del hemisferio infartado. La cuantificación de la infiltración de neutrófilos en cerebro se realizó 48h después de la cirugía por disociación mecánica del hemisferio infartado y purificación con gradientes de Percoll, antes de su tinción y análisis por citometría de flujo. El procedimiento completo se realizó en las instalaciones de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid.

## MODELO DE DAÑO PULMONAR AGUDO ASOCIADO A TRANSFUSIÓN (TRALI)

Hemos utilizado un modelo de daño pulmonar agudo asociado a transfusión que recapitula el síndrome TRALI en humanos. Este es un modelo en dos pasos que se ha ejecutado conforme a protocolos publicados ([Looney et al. 2009](#)). Para ello, ratones macho BALB/C fueron inyectados 0.1mg/kg de lipopolisacárido (LPS) por vía intraperitoneal. 24 horas después los animales recibieron una inyección intravenosa de 1mg/kg de anticuerpo anti-H2d (clon 34-1-2s, BioXcell). El daño pulmonar comienza de inmediato, y se analizó la supervivencia en la fase aguda, durante 2 horas. Como control se usaron animales tratados únicamente con LPS, que no causa muerte y origina una muy baja infiltración de neutrófilos al pulmón. Para analizar el número de neutrófilos infiltrados al pulmón se extrajeron los pulmones de los animales sacrificados y se realizó una inmunotinción usando anticuerpos contra Ly6G, CD41 y laminina para visualizar los neutrófilos, las plaquetas y la lámina



basal, respectivamente (véase protocolo de inmunotinción de cortes finos). Para el conteo absoluto se usó citometría de pulmones digeridos como se ha descrito anteriormente.

### MODELO DE SEPSIS POR LIGACIÓN CECAL Y PUNCIÓN (CLP)

El procedimiento se realizó de acuerdo a protocolos previamente publicados (Rittirsch et al. 2009). Los animales fueron anestesiados y se realizó una incisión de 1cm en la piel y en la fascia peritoneal para exponer la cavidad peritoneal. Se exteriorizó y ligó el 80% del ciego en posición distal a la válvula ileo-cecal con una sutura de seda del calibre 7. A continuación se perforaron ambas paredes del ciego en su zona distal con una aguja del calibre 23, y se extrajo una pequeña porción de su contenido a través de la punción. El ciego se devolvió a la cavidad abdominal y se suturó con sutura continua de seda del calibre 7 tanto la pared peritoneal como la piel. Se administró a los animales vía subcutánea suero salino y analgésicos (Buprex). Como control, se incluyeron animales operados de la misma manera pero sin punción (Sham).

### OTROS ENSAYOS FUNCIONALES

Hemos realizado otra serie de ensayos que en conjunto iban dirigidos a comprobar diversas capacidades funcionales en los neutrófilos tanto frescos como envejecidos. Entre ellos hemos verificado la capacidad fagocítica de unos y otros neutrófilos o su capacidad de producir especies reactivas de oxígeno. Otros ensayos se han centrado en aspectos moleculares, como el análisis de inhibición cruzada entre los receptores de quimioquinas CXCR4 y CXCR2, o la capacidad de unión con selectinas de los neutrófilos frescos o envejecidos. En conjunto, nos han permitido caracterizar mejor el fenotipo de los neutrófilos de uno u otro tipo.

### ENSAYO DE FAGOCITOSIS DE *CANDIDA ALBICANS*

Para analizar la capacidad fagocítica de los distintos mutantes contra *C. albicans* se utilizaron conidios marcados con 2.5µM de Cell Violet (Molecular Probes) los cuales fueron hervidos durante 30 minutos a 98°C (HKC, *heat killed conidia*). Para cuantificar la capacidad fagocítica se sortearon neutrófilos de sangre de los distintos mutantes y de animales WT y se marcaron con 5µM CFSE (Molecular Probes). Se expusieron los neutrófilos a las conidias en proporción 1:30 durante 15 minutos a 37°C. Tras un lavado, las células se recuperaron en PBS frío con 5mM EDTA. Para eliminar HKCs unidas pero no internalizadas, las células se incubaron con Tripsina-EDTA al 0,25% (Life Technologies) durante 15 minutos antes de recuperarlas y fijarlas con PFA al 4% en PBS. El análisis se realizó por citometría de flujo, considerando los eventos doble positivo para Cell Violet y CFSE como neutrófilos que han fagocitado HKCs. Se prepararon también muestras para microscopía para visualizar la fagocitosis.

## ENSAYOS DE INHIBICIÓN CRUZADA ENTRE CXCR4 Y CXCR2

Leucocitos de sangre se resuspendieron en RPMI 1640 (Invitrogen). Algunos grupos fueron tratados con 50ng/ml de CXCL12 (R&D Systems) durante 5 minutos a 37°C mientras otros se mantuvieron en idénticas condiciones pero sin tratar. Posteriormente, las células se colocaron en un pocillo de trans migración de 6.5mm con una membrana de policarbonato con un poro de 5µm (Corning, Corning, EEUU) y se incubaron a 37°C durante una hora para permitir la trans migración de las células hacia 50ng/ml de CXCL1 (R&D Systems) en el reservorio inferior. Transcurrido ese tiempo, las células trans migradas se recuperaron y marcaron con anticuerpos contra Ly6G y CD62L para su análisis citométrico. Como control se utilizó la migración basal hacia medio sin quimioquinas. La cuantificación absoluta se hizo utilizando microesferas de conteo como se ha indicado anteriormente.

## ENSAYOS DE UNIÓN DE SELECTINAS SOLUBLES

Se sangraron animales quimera por trasplante de médula ósea y se lisaron los eritrocitos como se ha descrito anteriormente. Para determinar la presencia de glicoproteínas con capacidad de unir selectinas endoteliales, los leucocitos resultantes se lavaron en RPMI 1640 con 5% FBS y se incubaron 15 minutos a 4°C utilizando selectinas solubles quiméricas P- o E-Selectina/IgM humano diluidas 1:3 en RPMI como se ha descrito anteriormente (Hidalgo et al. 2007). Posteriormente las células se incubaron con un anticuerpo contra Ly6G (clon 1A8) y contra IgM humano conjugado con FITC (Jackson Immunoresearch, West Grove, EEUU). Muestras control se incubaron en presencia de EDTA 5mM para impedir la unión calcio-dependiente de las selectinas y fueron tratadas igual que el resto de muestras. El análisis se realizó por citometría de flujo.

## ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS)

Para el análisis de la producción de ROS en los neutrófilos WT o experimentales, utilizamos un protocolo basado en la fluorescencia que adquiere el compuesto dihidrorrodamina (DHR, Molecular Probes) en presencia de varias especies reactivas de oxígeno. Se utilizaron animales quimera para evaluar la producción de las células WT y experimentales simultáneamente. Se sangraron las quimeras y se incubaron 50µl de sangre total con DHR (2.5µg/ml) en RPMI a 37°C durante 15 minutos. Se establecieron las siguientes condiciones para cada muestra: una muestra sin DHR como control negativo e incubada a 37°C, una muestra incubada siempre en hielo para obtener la mínima producción de ROS de las células, una muestra mantenida a 37°C sin ningún agente activador de los neutrófilos y por último una última condición incubada a 37°C y tratada con PMA (forbol miristato acetato) a 25µg/ml o endotoxina (LPS) a 20 µg/ml para activar a los neutrófilos. Tras la incubación, se lisaron los eritrocitos y se incubaron las células con anticuerpos contra Ly6G para iden-

tificar los neutrófilos. Finalmente, el nivel de producción de ROS de los neutrófilos WT y experimentales se analizó por citometría de flujo utilizando como medida de la producción de ROS la media geométrica de la intensidad de fluorescencia del DHR.

### ELIMINACIÓN DE NEUTRÓFILOS *IN VIVO*

En algunos experimentos se eliminaron los neutrófilos CXCR4<sup>AN</sup> circulantes *in vivo*. Para ello, los animales fueron inyectados 100µg de anticuerpo contra Ly6G (clon 1A8, Bioxcell) por vía intraperitoneal durante dos días consecutivos, lo que resultó en una disminución del 93% del número de neutrófilos circulantes. El número de linfocitos y monocitos no se ve afectado por este tratamiento (Casanova-Acebes et al. 2013).

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

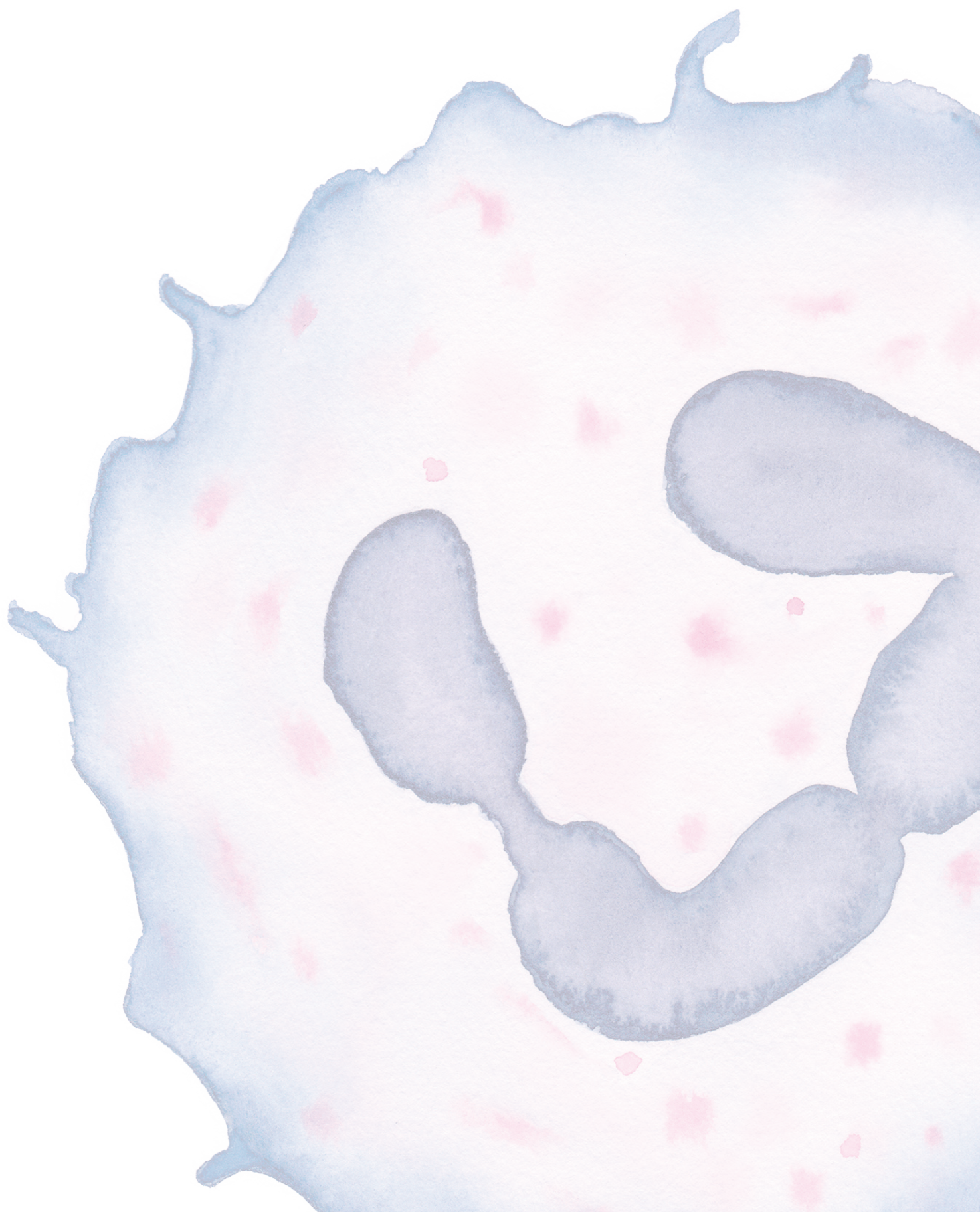
A lo largo del trabajo, los datos se muestran utilizando la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). Se usaron tests t de Student (t-tests) pareados o no pareados, en función del planteamiento experimental, para comparar dos grupos. Para comparar más de dos grupos usamos análisis de varianza de una vía (ANOVA) con test posterior de Tukey. Se aplicó un test de normalidad a los datos, utilizando el test de normalidad D'Agostino & Pearson o Shaphiro-Wilk. Para las curvas de supervivencia Kaplan-Meier se utilizó el análisis Log-Rank. No se utilizaron criterios de exclusión de outliers en la mayoría de los experimentos porque no se eliminaron datos muestrales a menos que hubiera evidencia de inflamación o enfermedad en un sujeto experimental. En estos casos se identificaron los outliers con el test de Grubb (método ESD). Para la determinación de la significancia de los patrones circadianos se ajustaron las curvas a patrones sinusoidales de amplitud circadiana con la técnica COSINOR (Cornelissen 2014), ajustando los datos a una curva basada en la fórmula " $y = \text{lineabase} + \text{amplitud} * \cos(\text{frecuencia} * T + \text{acrofase})$ ", donde *lineabase* es la media de todos los valores, *amplitud* es 1/2 del máximo-mínimo de los valores, *frecuencia* es  $2\pi/24$  (0,2618), *T* es el tiempo y *acrofase* es el tiempo de la acrofase). Para determinar si un comportamiento tenía carácter rítmico utilizamos las amplitudes de la curva calculadas con COSINOR y las comparamos con una curva hipotética de amplitud cero (es decir, sin comportamiento circadiano) asumiendo que ambas curvas tienen idénticas desviaciones estándar. Finalmente comparamos las amplitudes de ambas curvas utilizando un t-test no pareado. Este análisis permite considerar todos los puntos de la curva, en lugar del clásico análisis que emplea únicamente dos puntos (pico y valle) para la comparación y que es, por tanto, más sesgado. Este análisis de patrones circadianos se denomina "test de amplitud contra cero" en el texto. Para comprar dos curvas no circadianas en las que se analizan dos variables se utilizó un análisis de varianza de dos vías (ANOVA). Todos los análisis estadísticos se hicieron con Prism v6 (Graphpad Software, La Jolla, EEUU). Un valor p (*pvalue*) inferior a 0.05 se consideró estadísticamente significativo. En las figuras utiliza-

mos la siguiente nomenclatura: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . El test específico que se ha aplicado a cada experimento se especifica en el pie de figura.





## 8. Referencias





## Referencias

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H.H. & Pillai, S., 2014. Cellular and Molecular Immunology. , p.544. Disponible en: [http://books.google.es/books?id=RWYWBAQAQBAJ&printsec=frontcover&dq=abbas&hl=&cd=3&source=gbs\\_api](http://books.google.es/books?id=RWYWBAQAQBAJ&printsec=frontcover&dq=abbas&hl=&cd=3&source=gbs_api).
- Abram, C.L. et al., 2014. Comparative analysis of the efficiency and specificity of myeloid-Cre deleting strains using ROSA-EYFP reporter mice. *Journal of Immunological Methods*, 408, pp.89–100. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022175914001549>.
- Abram, C.L. & Lowell, C.A., 2009. The Ins and Outs of Leukocyte Integrin Signaling. *dx.doi.org*, 27(1), pp.339–362. Disponible en: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.immunol.021908.132554>.
- Acosta, J.C. et al., 2008. Control of senescence by CXCR2 and its ligands. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*, 7(19), pp.2956–2959. Disponible en: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/cc.7.19.6780>.
- Acosta, J.C. & Gil, J., 2009. A Role for CXCR2 in Senescence, but What about in Cancer? *Cancer Research*, 69(6), pp.2167–2170. Disponible en: <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-08-3772>.
- Adrover, J.M., Nicolás-Ávila, J.A. & Hidalgo, A., 2016. Aging: A Temporal Dimension for Neutrophils. *Trends in immunology*, 37(5), pp.1–12. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471490616000430>.
- Akamatsu, H. et al., 1990. The inhibition of free radical generation by human neutrophils through the synergistic effects of metronidazole with palmitoleic acid: a possible mechanism of action of metronidazole in rosacea and acne. *Archives of Dermatological Research*, 282(7), pp.449–454. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/BF00402621>.
- Akgul, C., Moulding, D.A. & Edwards, S.W., 2001. Molecular control of neutrophil apoptosis. *FEBS letters*, 487(3), pp.318–322. Disponible en: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=11163351&retmode=ref&cmd=prlinks>.
- Akopov, S.E., Simonian, N.A. & Grigorian, G.S., 1996. Dynamics of Polymorphonuclear Leukocyte Accumulation in Acute Cerebral Infarction and Their Correlation With Brain Tissue Damage. *Stroke*, 27(10), pp.1739–1743. Disponible en: <http://stroke.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.STR.27.10.1739>.
- Alanentalo, T., Asayesh, A. & Morrison, H., 2007. Tomographic molecular imaging and 3D quantification within adult mouse organs. *Nature*. Disponible en: <http://search.proquest.com/openview/70d4e821e7a6bf2e4741c53e1dc55628/1?pq-origsite=gscholar&cbl=28015>.

- Alcaide, P., Auerbach, S. & Lusinskas, F.W., 2009. Neutrophil Recruitment under Shear Flow: It's All about Endothelial Cell Rings and Gaps. *Microcirculation*. Disponible en: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10739680802273892>.
- Allingham, M.J., van Buul, J.D. & Burridge, K., 2007. ICAM-1-mediated, Src- and Pyk2-dependent vascular endothelial cadherin tyrosine phosphorylation is required for leukocyte transendothelial migration. *The Journal of Immunology*, 179(6), pp.4053–4064. Disponible en: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.179.6.4053>.
- Alon, R. et al., 2003. A novel genetic leukocyte adhesion deficiency in subsecond triggering of integrin avidity by endothelial chemokines results in impaired leukocyte arrest on vascular endothelium under shear flow. *Blood*, 101(11), pp.4437–4445. Disponible en: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2002-11-3427>.
- Anderson, D.C. & Springer, T.A., 1987. Leukocyte adhesion deficiency: an inherited defect in the Mac-1, LFA-1, and p150, 95 glycoproteins. *Annual review of medicine*. Disponible en: <http://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.me.38.020187.001135>.
- Andrian, U.H. von et al., 1995. A central role for microvillous receptor presentation in leukocyte adhesion under flow. *Cell*, 82(6), pp.989–999. Disponible en: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=7553859&retmode=ref&cmd=prlinks>.
- Antle, M.C. & Silver, R., 2005. Orchestrating time: arrangements of the brain circadian clock. *Trends in neurosciences*, 28(3), pp.145–151. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166223605000196>.
- Antonelou, M.H., Kriebardis, A.G. & Papassideri, I.S., 2010. Aging and death signalling in mature red cells: from basic science to transfusion practice. *Blood transfusion = Trasfusione del sangue*, 8 Suppl 3, p.NaN–NaN. Disponible en: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=20606748&retmode=ref&cmd=prlinks>.
- Arjona, A. et al., 2012. Immunity's fourth dimension: approaching the circadian-immune connection. *Trends in immunology*, 33(12), pp.607–612. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2012.08.007>.
- Arrayas, I.G. & Fernández, C.S., 2012. Impacto presupuestario para el Sistema Nacional de Salud de la Prevención del Trombolismo Venoso con apixaban en pacientes sometidos a artroplastia total de rodilla o cadera. *Revista Española de Salud Pública*. 86(6) pp.601–612. Disponible en: [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1135-57272012006600006](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1135-57272012006600006).
- Aschoff, J., 1954. Zeitgeber der tierischen Tagesperiodik. *Naturwissenschaften*, 41(3), pp.49–56. Disponible en: <http://link.springer.com/article/10.1007/BF00634164>.
- De Back, D.Z. et al., 2014. Of macrophages and red blood cells; a complex love story. *Frontiers in physiology*, 5, p.9. Disponible en: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2014.00009/abstract>.
- Baggiolini, M., Dewald, B. & Moser, B., 1993. Interleukin-8 and Related Chemotactic Cytokines—CXC and CC Chemokines. *Advances in Immunology Volume 55*, 55, pp.97–179. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S006527760860509X>.
- Bainton, D.F. et al., 1987. Leukocyte adhesion receptors are stored in peroxidase-negative granules of human neutrophils. *Journal of Experimental Medicine*, 166(6), pp.1641–1653. Disponible en: <http://www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.166.6.1641>.
- Bainton, D.F. & Farquhar, M.G., 1968. Differences in enzyme content of azurophil and specific granules of polymorphonuclear leukocytes. *The Journal of Cell Biology*. Disponible en: <http://jcb.rupress.org/content/39/2/286.abstract>.
- Bainton, D.F., Ulliyot, J.L. & Farquhar, M.G., 1971. The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow. *Journal of Experimental Medicine*, 134(4), pp.907–934. Disponible en: <http://pmc/articles/PMC2138991/?report=abstract>.
- Balabanian, K. et al., 2012. Proper desensitization of CXCR4 is required for lymphocyte development and peripheral compartmentalization in mice. *Blood*, 119(24), pp.5722–5730. Disponible en: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2012-01-403378>.



- Berson, D.M., 2007. Phototransduction in ganglion-cell photoreceptors. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 454(5), pp.849–855. Disponible en: <http://link.springer.com/article/10.1007/s00424-007-0242-2>.
- Bhana, N., 2007. Granulocyte colony-stimulating factors in the management of chemotherapy-induced neutropenia: evidence based review. *Current opinion in oncology*, 19(4), pp.328–335. Disponible en: [http://journals.lww.com/co-oncology/Fulltext/2007/07000/Granulocyte\\_colony\\_stimulating\\_factors\\_in\\_the.8.aspx](http://journals.lww.com/co-oncology/Fulltext/2007/07000/Granulocyte_colony_stimulating_factors_in_the.8.aspx).
- Borregaard, N., 2010. Neutrophils, from Marrow to Microbes. *Immunity*, 33(5), pp.657–670. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2010.11.011>.
- Borregaard, N. et al., 1992. Stimulus-dependent secretion of plasma proteins from human neutrophils. *Journal of Clinical Investigation*, 90(1), pp.86–96. Disponible en: <http://www.jci.org/articles/view/115860>.
- Borregaard, N., Sørensen, O.E. & Theilgaard-Mönch, K., 2007. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends in immunology*, 28(8), pp.340–345. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471490607001561>.
- Bratton, D.L. & Henson, P.M., 2011. Neutrophil clearance: when the party is over, clean-up begins. *Trends in immunology*, 32(8), pp.350–357. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2011.04.009>.
- Brinkmann, V. et al., 2004. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science (New York, N.Y.)*, 303(5663), pp.1532–1535. Disponible en: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1092385>.
- Brom, C., Brom, J. & König, W., 1992. Neomycin induces stimulatory and inhibitory effects on leukotriene generation, guanine triphosphatase activity, and actin polymerization within human neutrophils. *Immunology*, 75(1), pp.150–156. Disponible en: [/pmc/articles/PMC1384817/?report=abstract](http://pmc/articles/PMC1384817/?report=abstract).
- Broxmeyer, H.E. et al., 2005. Rapid mobilization of murine and human hematopoietic stem and progenitor cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist. *Journal of Experimental Medicine*, 201(8), pp.1307–1318. Disponible en: <http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20041385>.
- Bruehl, R.E., Springer, T.A. & Bainton, D.F., 1996. Quantitation of L-selectin distribution on human leukocyte microvilli by immunogold labeling and electron microscopy. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, 44(8), pp.835–844. Disponible en: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=8756756&retmode=ref&cmd=prlinks>.
- Brühl, M.-L. von et al., 2012. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *The Journal of experimental medicine*, 209(4), pp.819–835. Disponible en: <http://www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.20112322>.
- Bunger, M.K. et al., 2000. Mop3 Is an Essential Component of the Master Circadian Pacemaker in Mammals. *Cell*, 103(7), pp.1009–1017. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867400002051>.
- Burdon, P.C.E., Martin, C. & Rankin, S.M., 2008. Migration across the sinusoidal endothelium regulates neutrophil mobilization in response to ELR + CXC chemokines. *British Journal of Haematology*, 142(1), pp.100–108. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2141.2008.07018.x>.
- Cai, D.H. et al., 2008. C/EBP alpha:AP-1 leucine zipper heterodimers bind novel DNA elements, activate the PU.1 promoter and direct monocyte lineage commitment more potently than C/EBP alpha homodimers or AP-1. *Oncogene*, 27(19), pp.2772–2779. Disponible en: <http://www.nature.com/doi/10.1038/sj.onc.1210940>.
- Caielli, S., Banchereau, J. & Pascual, V., 2012. Neutrophils come of age in chronic inflammation. *Current Opinion in Immunology*, 24(6), pp.671–677. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.coi.2012.09.008>.
- Casanova-Acebes, M. et al., 2013. Rhythmic Modulation of the Hematopoietic Niche through Neutrophil Clearance. *Cell*, 153(5), pp.1025–1035. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867413005163>.



- Cash, J.L., White, G.E. & Greaves, D.R., 2009. Zymosan-Induced Peritonitis as a Simple Experimental System for the Study of Inflammation. *Chemokines, Part B*, 461(17), pp.379–396. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687909054172>.
- Cerutti, A., Puga, I. & Magri, G., 2013. The B cell helper side of neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology*, 94(4), pp.677–682. Disponible en: <http://www.jleukbio.org/content/94/4/677.full>.
- Chen, G. et al., 2014. Heme-induced neutrophil extracellular traps contribute to the pathogenesis of sickle cell disease. *Blood*, 123(24), pp.3818–3827. Disponible en: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2013-10-529982>.
- Chen, G., Zhuchenko, O. & Kuspa, A., 2007. Immune-like Phagocyte Activity in the Social Amoeba. *Science (New York, N.Y.)*, 317(5838), pp.678–681. Disponible en: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1143991>.
- Christoffersson, G. et al., 2012. VEGF-A recruits a proangiogenic MMP-9–delivering neutrophil subset that induces angiogenesis in transplanted hypoxic tissue. *Blood*, 120(23), pp.4653–4662. Disponible en: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2012-04-421040>.
- Clark, S.R. et al., 2007. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nature Medicine*, 13(4), pp.463–469. Disponible en: <http://www.nature.com/doi/finder/10.1038/nm1565>.
- Cornelissen, G., 2014. Cosinor-based rhythmometry. *Theoretical Biology and Medical Modelling*, 11(1), pp.1–24.
- Corominas, J. & Pascual, J.A., 1996. Diccionario crítico etimológico castellano e hispánico. , p.985. Disponible en: [http://books.google.es/books?id=Fj0jAQAIAAJ&dq=inauthor:corominas&hl=&cd=1&source=gbs\\_api](http://books.google.es/books?id=Fj0jAQAIAAJ&dq=inauthor:corominas&hl=&cd=1&source=gbs_api).
- Craciun, F.L., Schuller, E.R. & Remick, D.G., 2010. Early Enhanced Local Neutrophil Recruitment in Peritonitis-Induced Sepsis Improves Bacterial Clearance and Survival. *The Journal of Immunology*, 185(11), pp.6930–6938. Disponible en: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1002300>.
- Cutolo, M. & Straub, R.H., 2008. Circadian rhythms in arthritis: Hormonal effects on the immune/inflammatory reaction. *Autoimmunity reviews*, 7(3), pp.223–228. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1568997207001723>.
- Czeisler, C.A. et al., 1999. Stability, precision, and near-24-hour period of the human circadian pacemaker. *Science (New York, N.Y.)*, 284(5423), pp.2177–2181. Disponible en: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.284.5423.2177>.
- DeGraba, T.J., 1998. The role of inflammation after acute stroke: utility of pursuing anti-adhesion molecule therapy. *Neurology*, 51(3), p.NaN–NaN. Disponible en: [http://www.neurology.org/content/51/3\\_Suppl\\_3/S62.full](http://www.neurology.org/content/51/3_Suppl_3/S62.full).
- Devi, S. et al., 2013. Neutrophil mobilization via plerixafor-mediated CXCR4 inhibition arises from lung demargination and blockade of neutrophil homing to the bone marrow. *The Journal of experimental medicine*, 210(11), pp.2321–2336. Disponible en: <http://www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.20130056>.
- Diamond, M.S. et al., 1990. ICAM-1 (CD54): a counter-receptor for Mac-1 (CD11b/CD18). *The Journal of Cell Biology*, 111(6), pp.3129–3139. Disponible en: [/pmc/articles/PMC2116396/?report=abstract](http://pmc/articles/PMC2116396/?report=abstract).
- Dibner, C., Schibler, U. & Albrecht, U., 2010. The Mammalian Circadian Timing System: Organization and Coordination of Central and Peripheral Clocks. *dx.doi.org*, 72(1), pp.517–549. Disponible en: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-physiol-021909-135821>.
- Dimitrov, S. et al., 2009. Cortisol and epinephrine control opposing circadian rhythms in T cell subsets. *Blood*, 113(21), pp.5134–5143. Disponible en: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2008-11-190769>.
- Dinayer, M.C. et al., 1989. A missense mutation in the neutrophil cytochrome b heavy chain in cytochrome-positive X-linked chronic granulomatous disease. *Journal of Clinical Investigation*, 84(6), p.2012. Disponible en: [/pmc/articles/PMC304086/?report=abstract](http://pmc/articles/PMC304086/?report=abstract).

- Distelmaier, K., Adlbrecht, C. & Jakowitsch, J., 2009. Local complement activation triggers neutrophil recruitment to the site of thrombus formation in acute myocardial infarction. *Thromb ...*. Disponible en: [https://www.researchgate.net/profile/Klaus\\_Distelmaier/publication/26778237\\_Local\\_complement\\_activation\\_triggers\\_neutrophil\\_recruitment\\_to\\_the\\_site\\_of\\_thrombus\\_formation\\_in\\_acute\\_myocardial\\_infarction/links/00b7d5161dd70b8e8b000000.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Klaus_Distelmaier/publication/26778237_Local_complement_activation_triggers_neutrophil_recruitment_to_the_site_of_thrombus_formation_in_acute_myocardial_infarction/links/00b7d5161dd70b8e8b000000.pdf).
- Dowling, M.R. et al., 2010. Platelet senescence is regulated by an internal timer, not damage inflicted by hits. *Blood*, 116(10), pp.1776–1778. Disponible en: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2009-12-259663>.
- Drechsler, M. et al., 2010. Hyperlipidemia-Triggered Neutrophilia Promotes Early Atherosclerosis Clinical Perspective. *Circulation*, 122(18), pp.1837–1845. Disponible en: <http://circ.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.961714>.
- Druzd, D., Juan, A. & Scheiermann, C., 2014. Circadian rhythms in leukocyte trafficking. *Seminars in Immunopathology*. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s00281-013-0414-4>.
- Ducker, T.P. & Skubitz, K.M., 1992. Subcellular localization of CD66, CD67, and NCA in human neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology*, 52(1), pp.11–16. Disponible en: <http://www.jleukbio.org/content/52/1/11.abstract>.
- Eash, K.J. et al., 2010a. CXCR2 and CXCR4 antagonistically regulate neutrophil trafficking from murine bone marrow. *Journal of Clinical Investigation*, 120(7), pp.2423–2431. Disponible en: <http://www.jci.org/articles/view/41649>.
- Eash, K.J. et al., 2010b. CXCR2 and CXCR4 antagonistically regulate neutrophil trafficking from murine bone marrow. *Journal of Clinical Investigation*, 120(7), pp.2423–2431. Disponible en: <http://www.jci.org/articles/view/41649#sd>.
- Eash, K.J. et al., 2009. CXCR4 is a key regulator of neutrophil release from the bone marrow under basal and stress granulopoiesis conditions. *Blood*, 113(19), pp.4711–4719. Disponible en: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2008-09-177287>.
- Edgar, R.S. et al., 2012. Peroxiredoxins are conserved markers of circadian rhythms. *Nature* 485(7399), pp.459–464. Disponible en: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature11088>.
- Van Eeden, S.F. et al., 1997. Polymorphonuclear leukocytes L-selectin expression decreases as they age in circulation. *The American journal of physiology*, 272(1). Disponible en: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=9038962&retmode=ref&cmd=prlinks>.
- Elenkov, I.J. & Chrousos, G.P., 2000. Neuroendocrine Regulation of IL-12 and TNF- $\alpha$ /IL-10 Balance: Clinical Implications. *Annals of the New York ...*, (1). Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1749-6632.2000.tb05374.x/full>.
- Engelmann, B. & Massberg, S., 2013. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 13(1), pp.34–45. Disponible en: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nri3345>.
- Erlandsen, S.L., Hasslen, S.R. & Nelson, R.D., 1993. Detection and spatial distribution of the beta 2 integrin (Mac-1) and L-selectin (LECAM-1) adherence receptors on human neutrophils by high-resolution field emission SEM. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, 41(3), pp.327–333. Disponible en: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=7679125&retmode=ref&cmd=prlinks>.
- Etzioni, A. et al., 1992. Recurrent severe infections caused by a novel leukocyte adhesion deficiency. *New England Journal of Medicine*. Disponible en: <http://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJM199212173272505>.
- Etzioni, A., Doerschuk, C.M. & Harlan, J.M., 1999. Of man and mouse: leukocyte and endothelial adhesion molecule deficiencies. *Blood*, 94(10), pp.3281–3288. Disponible en: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM199604043341407>.
- Faust, N. et al., 2000. Insertion of enhanced green fluorescent protein into the lysozyme gene creates mice with green fluorescent granulocytes and macrophages. *Blood*, 96(2), pp.719–726. Disponible en: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=10887140&retmode=ref&cmd=prlinks>.

- Finger, E.B. et al., 1996. A differential role for cell shape in neutrophil tethering and rolling on endothelial selectins under flow. *The Journal of Immunology*, 157(11), pp.5085–5096. Disponible en: <http://www.jimmunol.org/content/157/11/5085.abstract>.
- Frangogiannis, N.G. & Rosenzweig, A., 2012. Regulation of the Inflammatory Response in Cardiac Repair. *Circulation Research*, 110(1), pp.159–173. Disponible en: <http://circres.ahajournals.org/lookup/doi/10.1161/CIRCRESAHA.111.243162>.
- Frangogiannis, N.G., Smith, C.W. & Entman, M.L., 2002. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovascular Research*, 53(1), pp.31–47. Disponible en: [https://academic.oup.com/circovasres/article-lookup/doi/10.1016/S0008-6363\(01\)00434-5](https://academic.oup.com/circovasres/article-lookup/doi/10.1016/S0008-6363(01)00434-5).
- Freedman, R. & Kaufmann, W.J., 2007. Universe. Disponible en: [http://books.google.es/books?id=hfXHTJ6OK9oC&dq=freeman+universe&hl=&cd=11&source=gbs\\_api](http://books.google.es/books?id=hfXHTJ6OK9oC&dq=freeman+universe&hl=&cd=11&source=gbs_api).
- Frenette, P.S. et al., 1996. Susceptibility to infection and altered hematopoiesis in mice deficient in both P- and E-selectins. *Cell*, 84(4), pp.563–574. Disponible en: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/efetch.fcgi?dbfrom=pubmed&id=8598043&retmode=ref&cmd=prlinks>.
- Fuchs, T.A. et al., 2010. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(36), pp.15880–15885. Disponible en: <http://www.pnas.org/content/107/36/15880.full>.
- Fung, Y.L. & Silliman, C.C., 2009. The role of neutrophils in the pathogenesis of transfusion-related acute lung injury. *Transfusion Medicine Reviews*, 23(4), pp.266–283. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0887796309000558>.
- Furze, R.C. & Rankin, S.M., 2008. Neutrophil mobilization and clearance in the bone marrow. *Immunology*, 125(3), pp.281–288. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2567.2008.02950.x>.
- Furze, R.C. & Rankin, S.M., 2008. The role of the bone marrow in neutrophil clearance under homeostatic conditions in the mouse. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 22(9), pp.3111–3119. Disponible en: <http://www.fasebj.org/cgi/doi/10.1096/fj.08-109876>.
- Futosi, K., Fodor, S. & Mócsai, A., 2013. Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *International Immunopharmacology*, 17(3), pp.638–650. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2013.06.034>.
- García-Prieto, J., García-Ruiz, J.M. & Sanz-Rosa, D., 2014.  $\beta$ 3 adrenergic receptor selective stimulation during ischemia/reperfusion improves cardiac function in translational models through inhibition of mPTP opening in cardiomyocytes. *Basic Research in Cardiology*, 109(4), p.422. Disponible en: <http://link.springer.com/article/10.1007/s00395-014-0422-0>.
- Gekakis, N. et al., 1998. Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science (New York, N.Y.)*, 280(5369), pp.1564–1569. Disponible en: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.280.5369.1564>.
- Gómez-Álvarez, R.P., 2007. Citología e histología vegetal y animal. , p.545. Disponible en: [http://books.google.es/books?id=cuUpPwAACAAJ&dq=paniagua+citologia&hl=&cd=18&source=gbs\\_api](http://books.google.es/books?id=cuUpPwAACAAJ&dq=paniagua+citologia&hl=&cd=18&source=gbs_api).
- Gordy, C. et al., 2011. Regulation of steady-state neutrophil homeostasis by macrophages. *Blood*, 117(2), pp.618–629. Disponible en: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2010-01-265959>.
- Graham, F.D. et al., 2009. Oxidative stress-induced changes in pyridine nucleotides and chemoattractant 5-lipoxygenase products in aging neutrophils. *Free Radical Biology and Medicine*, 47(1), pp.62–71. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.04.016>.
- Greenbaum, A. et al., 2013. CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance. *Nature*, 495(7440), pp.227–230. Disponible en: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature11926>.
- Gunther, M.R., Mao, J. & Cohen, M.S., 1993. Oxidant-scavenging activities of ampicillin and sulbactam and their effects on neutrophil functions. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37(5), pp.950–956. Disponible en: <http://aac.asm.org/cgi/doi/10.1128/AAC.37.5.950>.

- Halberg, F., Halberg, E. & Barnum, C.P., 1959. Physiologic 24-hour periodicity in human beings and mice, the lighting regimen and daily routine. Disponible en: [http://scholar.google.com/scholar?q=related:J6NROz2yG0YJ:scholar.google.com/&hl=en&num=20&cas\\_sdt=0,5](http://scholar.google.com/scholar?q=related:J6NROz2yG0YJ:scholar.google.com/&hl=en&num=20&cas_sdt=0,5).
- Hans D Ochs, M.D. med, C I Edvard Smith, P. & Jennifer M Puck, M.D., 2013. Primary Immunodeficiency Diseases. , p.800. Disponible en: [http://books.google.es/books?id=Kc48BAAAQ-BAJ&pg=PA739&dq=Etzioni+A+Cell+adhesion+and+leukocyte+adhesion+defects&hl=&cd=3&source=gbs\\_api](http://books.google.es/books?id=Kc48BAAAQ-BAJ&pg=PA739&dq=Etzioni+A+Cell+adhesion+and+leukocyte+adhesion+defects&hl=&cd=3&source=gbs_api).
- Hasenberg, A. et al., 2015. Catchup: a mouse model for imaging-based tracking and modulation of neutrophil granulocytes. *Nature Methods*, 12(5), pp.445–452. Disponible en: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nmeth.3322>.
- Haus, E. et al., 1983. Chronobiology in hematology and immunology. *American Journal of Anatomy*, 168(4), pp.467–517. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1002/aja.1001680406>.
- Heidt, T. et al., 2014. Chronic variable stress activates hematopoietic stem cells. *Nature Medicine*, 20(7), pp.754–758. Disponible en: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nm.3589>.
- Helseth, R. et al., 2016. The Time Course of Markers of Neutrophil Extracellular Traps in Patients Undergoing Revascularisation for Acute Myocardial Infarction or Stable Angina Pectoris. *Mediators of inflammation*, 2016, pp.1–8. Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/mi/2016/2182358/>.
- Herter, J. & Zarbock, A., 2013. Integrin Regulation during Leukocyte Recruitment. *The Journal of Immunology*, 190(9), pp.4451–4457. Disponible en: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1203179>.
- Hidalgo, A. et al., 2007. Complete Identification of E-Selectin Ligands on Neutrophils Reveals Distinct Functions of PSGL-1, ESL-1, and CD44. *Immunity*, 26(4), pp.477–489. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761307002154>.
- Hidalgo, A. et al., 2009. Heterotypic interactions enabled by polarized neutrophil microdomains mediate thromboinflammatory injury. *Nature Medicine*, 15(4), pp.384–391. Disponible en: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nm.1939>.
- Hong, C. et al., 2012. Coordinate regulation of neutrophil homeostasis by liver X receptors in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 122(1), pp.337–347. Disponible en: <http://www.jci.org/articles/view/58393>.
- Horman, S.R. et al., 2009. Gfi1 integrates progenitor versus granulocytic transcriptional programming. *Blood*, 113(22), pp.5466–5475. Disponible en: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2008-09-179747>.
- Huber-Lang, M. et al., 2014. Double blockade of CD14 and complement C5 abolishes the cytokine storm and improves morbidity and survival in polymicrobial sepsis in mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 192(11), pp.5324–5331. Disponible en: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1400341>.
- Hyun, Y.-M. et al., 2012. Uropod elongation is a common final step in leukocyte extravasation through inflamed vessels. *Journal of Experimental Medicine*, 209(7), p.NaNaN. Disponible en: <http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20111426>.
- Inouye, S.T. & Kawamura, H., 1979. Persistence of circadian rhythmicity in a mammalian hypothalamic ‘island’ containing the suprachiasmatic nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(11), pp.5962–5966. Disponible en: <http://www.pnas.org/content/76/11/5962.abstract>.
- Ionita, M.G. et al., 2010. High neutrophil numbers in human carotid atherosclerotic plaques are associated with characteristics of rupture-prone lesions. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 30(9), pp.1842–1848. Disponible en: <http://atvb.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/ATVBAHA.110.209296>.
- Jablonska, J. et al., 2010. Neutrophils responsive to endogenous IFN- $\beta$  regulate tumor angiogenesis and growth in a mouse tumor model. *Journal of Clinical Investigation*, 120(4), pp.1151–1164. Disponible en: <http://www.jci.org/articles/view/37223>.



- Jain, R., Tikoo, S. & Weninger, W., 2016. Recent advances in microscopic techniques for visualizing leukocytes in vivo. *F1000Research*, 5, p.915. Disponible en: <http://f1000research.com/articles/5-915/v1>.
- Janich, P. et al., 2011. The circadian molecular clock creates epidermal stem cell heterogeneity. *Nature*, 480(7376), pp.209–214. Disponible en: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature10649>.
- Jesaitis, A.J. et al., 1990. Ultrastructural localization of cytochrome b in the membranes of resting and phagocytosing human granulocytes. *Journal of Clinical Investigation*, 85(3), pp.821–835. Disponible en: <http://www.jci.org/articles/view/114509>.
- Jordan, J.E., Zhao, Z.-Q. & Vinten-Johansen, J., 1999. The role of neutrophils in myocardial ischemia–reperfusion injury. *Cardiovascular Research*, 43(4), pp.860–878. Disponible en: [https://academic.oup.com/circres/article-lookup/doi/10.1016/S0008-6363\(99\)00187-X](https://academic.oup.com/circres/article-lookup/doi/10.1016/S0008-6363(99)00187-X).
- Kaufman, J., 2010. Evolution and immunity. *Immunology* 130(4), pp.459–462. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2567.2010.03294.x>.
- Keszei, M. & Westerberg, L.S., 2014. Congenital Defects in Neutrophil Dynamics. *Journal of Immunology Research*, pp.1–15. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4139026/pdf/JIR2014-303782.pdf>.
- Kiel, M.J. & Morrison, S.J., 2006. Maintaining Hematopoietic Stem Cells in the Vascular Niche. *Immunity*, 25(6), pp.862–864. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761306005206>.
- Kimball, A.S. et al., 2016. The Emerging Role of NETs in Venous Thrombosis and Immunothrombosis. *Frontiers in immunology*, 7(5663), p.1532. Disponible en: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fimmu.2016.00236/abstract>.
- Kim, J.Y. et al., 2016. Inflammation after Ischemic Stroke: The Role of Leukocytes and Glial Cells. *Experimental Neurobiology*, 25(5), pp.241–251. Disponible en: <https://synapse.koreamed.org/DOIx.php?id=10.5607/en.2016.25.5.241>.
- Kishore, S.P. et al., 2004. Selective suppression of Toll-like receptor 4 activation by chemokine receptor 4. *FEBS letters*, 579(3), pp.699–704. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1016/j.febslet.2004.12.047>.
- Klein, D.C. & Moore, R.Y., 1991. Suprachiasmatic nucleus: the mind's clock. Disponible en: [http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=8fgwFsmTBwgC&oi=fnd&pg=PR16&dq=Suprachiasmatic+Nucleus+klein&ots=qTKlb9R45R&sig=6dfQ\\_yuTl3YLAz3URdQkf8o9Toz8](http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=8fgwFsmTBwgC&oi=fnd&pg=PR16&dq=Suprachiasmatic+Nucleus+klein&ots=qTKlb9R45R&sig=6dfQ_yuTl3YLAz3URdQkf8o9Toz8).
- Knight, J.S. et al., 2015. Peptidylarginine deiminase inhibition disrupts NET formation and protects against kidney, skin and vascular disease in lupus-prone MRL/lpr mice. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 74(12), pp.2199–2206. Disponible en: <http://ard.bmj.com/lookup/doi/10.1136/annrheumdis-2014-205365>.
- Knight, J.S. et al., 2014. Peptidylarginine deiminase inhibition reduces vascular damage and modulates innate immune responses in murine models of atherosclerosis. *Circulation Research*, 114(6), pp.947–956. Disponible en: <http://circres.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/CIRCRESA-HA.114.303312>.
- Köhler, A. et al., 2011. G-CSF-mediated thrombopoietin release triggers neutrophil motility and mobilization from bone marrow via induction of Cxcr2 ligands. *Blood*, 117(16), pp.4349–4357. Disponible en: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2010-09-308387>.
- Kolaczowska, E. & Kubes, P., 2013. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 13(3), pp.159–175. Disponible en: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nri3399>.
- Kreisel, D. et al., 2010. In vivo two-photon imaging reveals monocyte-dependent neutrophil extravasation during pulmonary inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(42), pp.18073–18078. Disponible en: <http://www.pnas.org/content/107/42/18073.full>.
- Kume, K. et al., 1999. mCRY1 and mCRY2 Are Essential Components of the Negative Limb of the Circadian Clock Feedback Loop. *Cell*, 98(2), pp.193–205. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867400810144>.



- Kunkel, E.J. & Ley, K., 1996. Distinct Phenotype of E-Selectin-Deficient Mice. *Circulation Research*, 79(6), pp.1196–1204. Disponible en: <http://circres.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.RES.79.6.1196>.
- Kuwano, Y. et al., 2010. Rolling on E- or P-selectin induces the extended but not high-affinity conformation of LFA-1 in neutrophils. *Blood*, 116(4), pp.617–624. Disponible en: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2010-01-266122>.
- Kyne, L. et al., 2000. Neutrophilia and congestive heart failure after acute myocardial infarction. *American Heart Journal*, 139(1), pp.94–100. Disponible en: <http://www.ahjonline.com/article/S0002870300700147/fulltext>.
- Lambeth, J.D., 2004. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nature Reviews Immunology*, 4(3), pp.181–189. Disponible en: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=15039755&retmode=ref&cmd=prlinks>.
- Langereis, J.D., 2014. Neutrophil integrin affinity regulation in adhesion, migration, and bacterial clearance. *Cell Adhesion & Migration*, 7(6), pp.486–491. Disponible en: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/cam.27293>.
- Lange, T., Dimitrov, S. & Born, J., 2010. Effects of sleep and circadian rhythm on the human immune system. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1193(1), pp.48–59. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1749-6632.2009.05300.x>.
- Langner, R. & Rensing, L., 1972. Notizen: Circadian Rhythm of Oxygen Consumption in Rat Liver Suspension Culture: Changes of Pattern. *Zeitschrift für Naturforschung B*. Disponible en: <https://www.degruyter.com/view/j/znb.1972.27.issue-9/znb-1972-0945/znb-1972-0945.xml>.
- Lapidot, T. & Petit, I., 2002. Current understanding of stem cell mobilization: the roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells. *Experimental hematology*, 30(9), pp.973–981. Disponible en: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=12225788&retmode=ref&cmd=prlinks>.
- Lard, L.R. et al., 1999. Neutrophil activation in sickle cell disease. *Journal of Leukocyte Biology*, 66(3), pp.411–415. Disponible en: <http://www.jleukbio.org/content/66/3/411.abstract>.
- Lavin, Y. et al., 2014. Tissue-Resident Macrophage Enhancer Landscapes Are Shaped by the Local Microenvironment. *Cell*, 159(6), pp.1312–1326. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.018>.
- Leliefeld, P.H.C. et al., 2016. The role of neutrophils in immune dysfunction during severe inflammation. *Critical Care*, 20(1), pp.1–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/s13054-016-1250-4>.
- Ley, K. et al., 2007. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature Reviews Immunology*, 7(9), pp.678–689. Disponible en: <http://www.nature.com/doi/finder/10.1038/nri2156>.
- Lichtman, M.A. & Weed, R.I., 1970. Electrophoretic mobility and N-acetyl neuraminic acid content of human normal and leukemic lymphocytes and granulocytes. *Blood*, 35(1), pp.12–22. Disponible en: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=5412671&retmode=ref&cmd=prlinks>.
- Lim, J. et al., 2014. Light sheet fluorescence microscopy (LSFM): past, present and future. *Analyst*, 139(19), pp.4758–4768. Disponible en: <http://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2014/an/c4an00624k>.
- Liu, Y. et al., 2014. The microbiota regulates neutrophil homeostasis and host resistance to Escherichia coli K1 sepsis in neonatal mice. *Nature Medicine*, 20(5), pp.524–530. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nm.3542>.
- Looney, M.R. et al., 2009. Platelet depletion and aspirin treatment protect mice in a two-event model of transfusion-related acute lung injury. *Journal of Clinical Investigation*, 119(11), pp.3450–3461. Disponible en: <http://www.jci.org/articles/view/38432>.
- Looney, M.R. et al., 2011. Stabilized imaging of immune surveillance in the mouse lung. *Nature Methods*, 8(1), pp.91–96. Disponible en: <http://www.nature.com/doi/finder/10.1038/nmeth.1543>.

- Lorant, D.E., 1991. Coexpression of GMP-140 and PAF by endothelium stimulated by histamine or thrombin: a juxtacrine system for adhesion and activation of neutrophils. *The Journal of Cell Biology*, 115(1), pp.223–234. Disponible en: <http://www.jcb.org/cgi/doi/10.1083/jcb.115.1.223>.
- Lowe, J.B., 2003. Glycan-dependent leukocyte adhesion and recruitment in inflammation. *Current opinion in cell biology*, 15(5), pp.531–538. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S095506740300111X>.
- Lutz, H.U. & Bogdanova, A., 2013. Mechanisms tagging senescent red blood cells for clearance in healthy humans. *Frontiers in physiology*, 4, p.387. Disponible en: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2013.00387/abstract>.
- MacCallum, D.M., 2009. Massive induction of innate immune response to *Candida albicans* in the kidney in a murine intravenous challenge model. *FEMS yeast research*, 9(7), pp.1111–1122. Disponible en: <https://academic.oup.com/femsyr/article-lookup/doi/10.1111/j.1567-1364.2009.00576.x>.
- Mackett, R.L. & Guay, D.R., 1985. Vancomycin-induced neutropenia. *Canadian Medical Association Journal*, 132(1), pp.39–40. Disponible en: [/pmc/articles/PMC1346502/?report=abstract](http://pmc/articles/PMC1346502/?report=abstract).
- Madisen, L. et al., 2010. A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nature Neuroscience*, 13(1), pp.133–140. Disponible en: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nn.2467>.
- De Mairan, M., 1729. Histoire de l'Académie royale des sciences, année MDCCXXIX avec les mémoires de mathématique & de physique, pour la même année. , pp.35–36. Disponible en: [http://books.google.es/books?id=AWkBAAAAYA&pg=PA47&dq=m+de+mairan+botanique&hl=&cd=1&source=gbp\\_api](http://books.google.es/books?id=AWkBAAAAYA&pg=PA47&dq=m+de+mairan+botanique&hl=&cd=1&source=gbp_api).
- Manfredini, R. et al., 2009. Circadian Variation in Stroke Onset: Identical Temporal Pattern in Ischemic and Hemorrhagic Events. *Chronobiology International*, 22(3), pp.417–453. Disponible en: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1081/CBI-200062927>.
- Mangold, A. et al., 2015. Coronary Neutrophil Extracellular Trap Burden and Deoxyribonuclease Activity in ST-Elevation Acute Coronary Syndrome Are Predictors of ST-Segment Resolution and Infarct Size Novelty and Significance. *Circulation Research*, 116(7), pp.1182–1192. Disponible en: <http://circres.ahajournals.org/lookup/doi/10.1161/CIRCRESAHA.116.304944>.
- Man, K., Loudon, A. & Chawla, A., 2016. Immunity around the clock. *Science (New York, N.Y.)*, 354(6315), pp.999–1003. Disponible en: <http://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.aah4966>.
- Manz, M.G. & Boettcher, S., 2014. Emergency granulopoiesis. *Nature Reviews Immunology*, 14(5), pp.302–314. Disponible en: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nri3660>.
- Ma, O. et al., 2014. Granulopoiesis requires increased C/EBP $\alpha$  compared to monopoiesis, correlated with elevated Cebpa in immature G-CSF receptor versus M-CSF receptor expressing cells. *PLoS ONE*, 9(4), p.e95784. Disponible en: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0095784>.
- Martin, C. et al., 2003a. Chemokines acting via CXCR2 and CXCR4 control the release of neutrophils from the bone marrow and their return following senescence. *Immunity*, 19(4), pp.583–593. Disponible en: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=14563322&retmode=ref&cmd=prlinks>.
- Martin, C. et al., 2003b. Chemokines acting via CXCR2 and CXCR4 control the release of neutrophils from the bone marrow and their return following senescence. *Immunity*, 19(4), pp.583–593. Disponible en: <file:///Users/jose/Downloads/main.pdf>.
- Mason, K.D. et al., 2007. Programmed Anuclear Cell Death Delimits Platelet Life Span. *Cell*, 128(6), pp.1173–1186. Disponible en: <http://www.cell.com/article/S0092867407001961/fulltext>.
- Massberg, S. et al., 2010. Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nature Medicine*, 16(8), pp.887–896. Disponible en: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nm.2184>.
- Massena, S. et al., 2015. Identification and characterization of VEGF-A-responsive neutrophils expressing CD49d, VEGFR1, and CXCR4 in mice and humans. *Blood*, 126(17), pp.2016–2026. Disponible en: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2015-03-631572>.

- McDonald, B. & Kubes, P., 2010. Chemokines: Sirens of Neutrophil Recruitment-but Is It Just One Song? *Immunity*, 33(2), pp.148–149. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2010.08.006>.
- McEver, R.P., 2015. Selectins: initiators of leucocyte adhesion and signalling at the vascular wall. *Cardiovascular Research*, 107(3), pp.331–339. Disponible en: <https://academic.oup.com/cardiovascres/article-lookup/doi/10.1093/cvr/cvv154>.
- Medzhitov, R., 2008. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454(7203), pp.428–435. Disponible en: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nature07201>.
- Menaker, M., Moreira, L.F. & Tosini, G., 1997. Evolution of circadian organization in vertebrates. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 30(3), pp.305–313. Disponible en: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-879X1997000300003&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-879X1997000300003&lng=en&nrm=iso&tlng=en).
- Menaker, M. & Tosini, G., 1996. The evolution of vertebrate circadian systems. Disponible en: [http://scholar.google.com/scholar?q=related:6L1xIrLBRAcJ:scholar.google.com/&hl=en&num=20&as\\_sdt=0,5](http://scholar.google.com/scholar?q=related:6L1xIrLBRAcJ:scholar.google.com/&hl=en&num=20&as_sdt=0,5).
- Méndez-Ferrer, S. et al., 2008. Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations. *Nature*, 452(7186), pp.442–447. Disponible en: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nature06685>.
- Menet, J.S., Pescatore, S. & Rosbash, M., 2014. CLOCK:BMAL1 is a pioneer-like transcription factor. *Genes & Development*, 28(1), pp.8–13. Disponible en: <http://genesdev.cshlp.org/cgi/doi/10.1101/gad.228536.113>.
- Mercier, F.E., Ragu, C. & Scadden, D.T., 2012. The bone marrow at the crossroads of blood and immunity. *Nature Publishing Group*, 12(1), pp.49–60. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nri3132>.
- Metchnikoff, E., 1893. Lectures on the comparative pathology of inflammation: delivered at the Pasteur Institute in 1891. Disponible en: [http://scholar.google.com/scholar?q=related:PlyU5dmUgesJ:scholar.google.com/&hl=en&num=20&as\\_sdt=0,5](http://scholar.google.com/scholar?q=related:PlyU5dmUgesJ:scholar.google.com/&hl=en&num=20&as_sdt=0,5).
- Metchnikov, E., 1905. Immunity in infectious diseases. Disponible en: [http://scholar.google.com/scholar?q=related:NZkPawJIddoJ:scholar.google.com/&hl=en&num=20&as\\_sdt=0,5&as\\_ylo=1905&as\\_yhi=1905](http://scholar.google.com/scholar?q=related:NZkPawJIddoJ:scholar.google.com/&hl=en&num=20&as_sdt=0,5&as_ylo=1905&as_yhi=1905).
- Mócsai, 2015. Intracellular signaling during neutrophil recruitment. , pp.1–36.
- Mócsai, A., 2013. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *Journal of Experimental Medicine*, 210(7), pp.1283–1299. Disponible en: <http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20122220>.
- Mócsai, A., Walzog, B. & Lowell, C.A., 2015. Intracellular signalling during neutrophil recruitment. *Cardiovascular Research*, 107(3), pp.373–385. Disponible en: <https://academic.oup.com/cardiovascres/article-lookup/doi/10.1093/cvr/cvv159>.
- Moore, K.L. et al., 1995. P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates rolling of human neutrophils on P-selectin. *The Journal of Cell Biology*, 128(4), pp.661–671. Disponible en: <http://www.jcb.org/cgi/doi/10.1083/jcb.128.4.661>.
- Morrison, S.J. & Scadden, D.T., 2014. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature*, 505(7483), pp.327–334. Disponible en: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nature12984>.
- Mossadegh-Keller, N. et al., 2013. M-CSF instructs myeloid lineage fate in single haematopoietic stem cells. *Nature*, 497(7448), pp.239–243. Disponible en: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nature12026>.
- Moticka, E.J., 2015. A Historical Perspective on Evidence-Based Immunology. , p.394. Disponible en: [http://books.google.es/books?id=2TMwAAAAQBAJ&pg=PA381&dq=A+Historical+Perspective+on+Evidence+Based+Immunology&hl=&cd=1&source=gbs\\_api](http://books.google.es/books?id=2TMwAAAAQBAJ&pg=PA381&dq=A+Historical+Perspective+on+Evidence+Based+Immunology&hl=&cd=1&source=gbs_api).
- Muller, J.E. et al., 2010. Circadian Variation in the Frequency of Onset of Acute Myocardial Infarction. *dx.doi.org*, 313(21), pp.1315–1322. Disponible en: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM198511213132103>.

- Nader, N., Chrousos, G.P. & Kino, T., 2009. Circadian rhythm transcription factor CLOCK regulates the transcriptional activity of the glucocorticoid receptor by acetylating its hinge region lysine cluster: potential physiological implications. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 23(5), pp.1572–1583. Disponible en: <http://www.fasebj.org/content/23/5/1572.full>.
- Nagase, H. et al., 2002. Cytokine-mediated regulation of CXCR4 expression in human neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology*, 71(4), pp.711–717. Disponible en: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=11927659&retmode=ref&cmd=prlinks>.
- Nathan, C., 2006. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nature Reviews Immunology*, 6(3), pp.173–182. Disponible en: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nri1785>.
- Nelson, R.J. & Zucker, I., 1981. Absence of extraocular photoreception in diurnal and nocturnal rodents exposed to direct sunlight. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 69(1), pp.145–148. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0300962981906514>.
- Nguyen, K.D. et al., 2013. Circadian Gene Bmal1 Regulates Diurnal Oscillations of Ly6Chi Inflammatory Monocytes. *Science (New York, N.Y.)*, 341(6153), pp.1483–1488. Disponible en: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1240636>.
- Nicolás-Ávila, J.Á., Adrover, J.M. & Hidalgo, A., 2017. Neutrophils in Homeostasis, Immunity, and Cancer. *Immunity*, 46(1), pp.15–28. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2016.12.012>.
- Nie, Y. et al., 2004. The role of CXCR4 in maintaining peripheral B cell compartments and humoral immunity. *Journal of Experimental Medicine*, 200(9), pp.1145–1156. Disponible en: <http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20041185>.
- Noelia, A. & Castrillo, A., 2011. Liver X receptors as regulators of macrophage inflammatory and metabolic pathways. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925443910002930>.
- Nourshargh, S. & Alon, R., 2014. Leukocyte Migration into Inflamed Tissues. *Immunity*, 41(5), pp.694–707. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761314003847>.
- Omatsu, Y. et al., 2010. The Essential Functions of Adipo-osteogenic Progenitors as the Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Niche. *Immunity*, 33(3), pp.387–399. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761310003225>.
- Panzer, S.E. et al., 2003. Circadian variation of sputum inflammatory cells in mild asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 111(2), pp.308–312. Disponible en: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=12589350&retmode=ref&cmd=prlinks>.
- Parker, J.D. et al., 1994. Morning increase in ambulatory ischemia in patients with stable coronary artery disease. Importance of physical activity and increased cardiac demand. *Circulation*, 89(2), pp.604–614. Disponible en: <http://circ.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.CIR.89.2.604>.
- Passequé, E., Wagner, E.F. & Weissman, I.L., 2004. JunB deficiency leads to a myeloproliferative disorder arising from hematopoietic stem cells. *Cell*, 119(3), pp.431–443. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S009286740400950X>.
- Pelikan, P., Gimbrone, M.A. & Cotran, R.S., 1979. Distribution and movement of anionic cell surface sites in cultured human vascular endothelial cells. *Atherosclerosis*, 32(1), pp.69–80. Disponible en: <http://www.atherosclerosis-journal.com/article/0021915079901485/fulltext>.
- Petty, J.M. et al., 2009. Crosstalk between CXCR4/Stromal Derived Factor-1 and VLA-4/VCAM-1 Pathways Regulates Neutrophil Retention in the Bone Marrow. *The Journal of Immunology*, 182(1), pp.604–612. Disponible en: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.182.1.604>.
- Pfeiler, S. et al., 2016. Propagation of thrombosis by neutrophils and extracellular nucleosome networks. *Haematologica*. Disponible en: <http://www.haematologica.org/cgi/doi/10.3324/haematol.2016.142471>.
- Phillipson, M. et al., 2006. Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. *Journal of Experimental Medicine*, 203(12), pp.2569–2575. Disponible en: <http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20060925>.



- Phillipson, M. & Kubes, P., 2011. The neutrophil in vascular inflammation. *Nature Medicine*, 17(11), pp.1381–1390. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nm.2514>.
- Pillay, J. et al., 2012. A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. *Journal of Clinical Investigation*, 122(1), pp.327–336. Disponible en: <http://www.jci.org/articles/view/57990>.
- Pittendrigh, C.S., 1960. Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 25, pp.159–184. Disponible en: <http://symposium.cshlp.org/cgi/doi/10.1101/SQB.1960.025.01.015>.
- Pober, J.S. & Tellides, G., 2012. Participation of blood vessel cells in human adaptive immune responses. *Trends in immunology*, 33(1), pp.49–57. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471490611001542>.
- Pollock, J.D. et al., 1995. Mouse model of X-linked chronic granulomatous disease, an inherited defect in phagocyte superoxide production. *Nature Genetics*, 9(2), pp.202–209. Disponible en: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=7719350&retmode=ref&cmd=prlinks>.
- Postic, C. et al., 1999. Dual roles for glucokinase in glucose homeostasis as determined by liver and pancreatic beta cell-specific gene knock-outs using Cre recombinase. *Journal of Biological Chemistry*, 274(1), pp.305–315. Disponible en: <http://www.jbc.org/content/274/1/305.full>.
- Preitner, N. et al., 2002. The Orphan Nuclear Receptor REV-ERB $\alpha$  Controls Circadian Transcription within the Positive Limb of the Mammalian Circadian Oscillator. *Cell*, 110(2), pp.251–260. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867402008255>.
- Price, T.H., Chatta, G.S. & Dale, D.C., 1996. Effect of recombinant granulocyte colony-stimulating factor on neutrophil kinetics in normal young and elderly humans. *Blood*, 88(1), pp.335–340. Disponible en: <http://www.bloodjournal.org/content/88/1/335.abstract>.
- Provencio, I. et al., 2000. A novel human opsin in the inner retina. *Journal of Neuroscience*, 20(2), pp.600–605. Disponible en: <http://www.jgp.org/cgi/doi/10.1085/jgp.46.6.1249>.
- Puga, I. et al., 2011. B cell-helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen. *Nature Immunology*, 13(2), pp.170–180. Disponible en: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ni.2194>.
- Raffler, N.A., Rivera-Nieves, J. & Ley, K., 2005. L-selectin in inflammation, infection and immunity. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies*, 2(3), pp.213–220. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S174067730500063X>.
- Ralph, M.R. et al., 1990. Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science (New York, N.Y.)*. Disponible en: <http://search.proquest.com/openview/db5b85b2c030c238c04d5a9a85b66791/1?pq-origsite=gscholar&cbl=1256>.
- Rankin, S.M., 2010. The bone marrow: a site of neutrophil clearance. *Journal of Leukocyte Biology*, 88(2), pp.241–251. Disponible en: <http://www.jleukbio.org/cgi/doi/10.1189/jlb.0210112>.
- Raskob, G.E. et al., 2014. Thrombosis: A Major Contributor to Global Disease Burden. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 40(7), pp.724–735. Disponible en: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0034-1390325>.
- Remijsen, Q. et al., 2011. Dying for a cause: NETosis, mechanisms behind an antimicrobial cell death modality. *Cell death and differentiation*, 18(4), pp.581–588. Disponible en: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/cdd.2011.1>.
- Rey, M. et al., 2007. Myosin IIA is involved in the endocytosis of CXCR4 induced by SDF-1 $\alpha$ . *Journal of Cell Science*, 120(6), pp.1126–1133. Disponible en: <http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.03415>.
- Richardson, D.S. & Lichtman, J.W., 2015. Clarifying Tissue Clearing. *Cell*, 162(2), pp.246–257. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.06.067>.
- Rittirsch, D. et al., 2009. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nature Protocols*, 4(1), pp.31–36. Disponible en: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nprot.2008.214>.



- Sadik, C.D., Kim, N.D. & Luster, A.D., 2011. Neutrophils cascading their way to inflammation. *Trends in immunology*, 32(10), pp.452–460. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2011.06.008>.
- Sato, T.K. et al., 2004. A Functional Genomics Strategy Reveals Rora as a Component of the Mammalian Circadian Clock. *Neuron*, 43(4), pp.527–537. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S089662730400460X>.
- Sauer, B. & Henderson, N., 1988. Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(14), pp.5166–5170. Disponible en: <http://www.pnas.org/content/85/14/5166.abstract>.
- Scheiermann, C. et al., 2012. Adrenergic Nerves Govern Circadian Leukocyte Recruitment to Tissues. *Immunity*, 37(2), pp.290–301. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761312002920>.
- Scheiermann, C., Frenette, P.S. & Hidalgo, A., 2015. Regulation of leucocyte homeostasis in the circulation. *Cardiovascular Research*, 107(3), pp.340–351. Disponible en: <http://cardiovascres.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/cvr/cvv099>.
- Scheiermann, C., Kunisaki, Y. & Frenette, P.S., 2013. Circadian control of the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 13(3), pp.190–198. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nri3386>.
- Schindelin, J. et al., 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), pp.676–682. Disponible en: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nmeth.2019>.
- Schindelin, J. et al., 2015. The ImageJ ecosystem: An open platform for biomedical image analysis. *Molecular Reproduction and Development*, 82(7), pp.518–529. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mrd.22489/full>.
- Schloss, M.J. et al., 2016. The time-of-day of myocardial infarction onset affects healing through oscillations in cardiac neutrophil recruitment. *EMBO Molecular Medicine*, pp.1–12. Disponible en: <http://embomolmed.embopress.org/cgi/doi/10.15252/emmm.201506083>.
- Schmidt, E.P. et al., 2011. On, around, and through: neutrophil-endothelial interactions in innate immunity. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 26(5), pp.334–347. Disponible en: <http://physiologyonline.physiology.org/cgi/doi/10.1152/physiol.00011.2011>.
- Segel, G.B., Halterman, M.W. & Lichtman, M.A., 2011. The paradox of the neutrophil's role in tissue injury. *Journal of Leukocyte Biology*, 89(3), pp.359–372. Disponible en: <http://www.jleukbio.org/content/89/3/359.full>.
- Semerad, C.L. et al., 2002. G-CSF is an essential regulator of neutrophil trafficking from the bone marrow to the blood. *Immunity*, 17(4), pp.413–423. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761302004247>.
- Semeraro, F. et al., 2011. Extracellular histones promote thrombin generation through platelet-dependent mechanisms: involvement of platelet TLR2 and TLR4. *Blood*, 118(7), pp.1952–1961. Disponible en: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2011-03-343061>.
- Servant, G. et al., 2000. Polarization of Chemoattractant Receptor Signaling During Neutrophil Chemotaxis. *Science (New York, N.Y.)*, 287(5455), pp.1037–1040. Disponible en: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.287.5455.1037>.
- Shearman, L.P. et al., 2000. Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science (New York, N.Y.)*, 288(5468), pp.1013–1019. Disponible en: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.288.5468.1013>.
- Shuster, D.E. et al., 1995. Neutrophilia in mice that lack the murine IL-8 receptor homolog. *Science (New York, N.Y.)*, 269(5230), pp.1590–1592. Disponible en: <http://go.galegroup.com/ps/i.do?p=AONE&sw=w&issn=00368075&v=2.1&it=r&id=GALE%7CA17482247&sid=googleScholar&linkaccess=fulltext>.
- Silvestre-Roig, C., Hidalgo, A. & Soehnlein, O., 2016. Neutrophil heterogeneity: implications for homeostasis and pathogenesis. *Blood*, 127(18), pp.2173–2181. Disponible en: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2016-01-688887>.

- Simon, S.I. et al., 2007. Dynamics of Neutrophil Membrane Compliance and Microstructure probed with a Micropipet-based Piconewton Force Transducer. *Annals of Biomedical Engineering*, 35(4), pp.595–604. Disponible en: <http://link.springer.com/article/10.1007/s10439-007-9260-7>.
- Sperandio, M., Gleissner, C.A. & Ley, K., 2009. Glycosylation in immune cell trafficking. *Immunological Reviews*, 230(1), pp.97–113. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-065X.2009.00795.x>.
- Spits, H. & Di Santo, J.P., 2011. The expanding family of innate lymphoid cells: regulators and effectors of immunity and tissue remodeling. *Nature Immunology*, 12(1), pp.21–27. Disponible en: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ni.1962>.
- Springer, T.A. & Dustin, M.L., 2012. Integrin inside-out signaling and the immunological synapse. *Current opinion in cell biology*, 24(1), pp.107–115. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0955067411001347>.
- Sreeramkumar, V. et al., 2014. Neutrophils scan for activated platelets to initiate inflammation. *Science (New York, N.Y.)*, 346(6214), pp.1234–1238. Disponible en: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=25477463&retmode=ref&cmd=prlinks>.
- Stadtmann, A. & Zarbock, A., 2012. CXCR2: From Bench to Bedside. *Frontiers in immunology*, 3, p.263. Disponible en: <https://mail.google.com/mail/u/0/?hl=es&shva=1>.
- Stark, M.A. et al., 2005. Phagocytosis of Apoptotic Neutrophils Regulates Granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity*, 22(3), pp.285–294. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761305000403>.
- Stephan, F.K. & Zucker, I., 1972. Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 69(6), pp.1583–1586. Disponible en: <http://www.pnas.org/content/69/6/1583.abstract>.
- Suarez-Barrientos, A. et al., 2011. Circadian variations of infarct size in acute myocardial infarction. *Heart*, 97(12), pp.970–976. Disponible en: <http://heart.bmj.com/cgi/doi/10.1136/hrt.2010.212621>.
- Summers, C. et al., 2010. Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends in immunology*, 31(8), pp.318–324. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2010.05.006>.
- Sundar, I.K. et al., 2015. Circadian molecular clock in lung pathophysiology. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 309(10), p.L1056. Disponible en: <http://ajplung.physiology.org/lookup/doi/10.1152/ajplung.00152.2015>.
- Sundd, P. et al., 2012. ‘Slings’ enable neutrophil rolling at high shear. *Nature*, 488(7411), pp.399–403. Disponible en: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nature11248>.
- Suratt, B.T. et al., 2001. Neutrophil maturation and activation determine anatomic site of clearance from circulation. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 281(4), p.NaN–NaN. Disponible en: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=11557595&retmode=ref&cmd=prlinks>.
- Talukdar, S. et al., 2012. Neutrophils mediate insulin resistance in mice fed a high-fat diet through secreted elastase. *Nature Medicine*, 18(9), pp.1407–1412. Disponible en: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nm.2885>.
- Tanji-Matsuba, K. et al., 1998. Functional changes in aging polymorphonuclear leukocytes. *Circulation*, 97(1), pp.91–98. Disponible en: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=9443436&retmode=ref&cmd=prlinks>.
- Teich, J.M., Young, I.T. & Sher, S.E., 1979. Transformation of nuclear morphology during cellular maturation. *Journal of Histochemistry ...*, 27(1), pp.193–198. Disponible en: <http://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/27.1.438500>.
- Tromp, S.W., 1963. Medical biometeorology: weather, climate and the living organism. Disponible en: <http://library.wur.nl/WebQuery/clc/495342>.
- Uhl, B. et al., 2016. Aged neutrophils contribute to the first line of defense in the acute inflammatory response. *Blood*, pp.1–33. Disponible en: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2016-05-718999>.

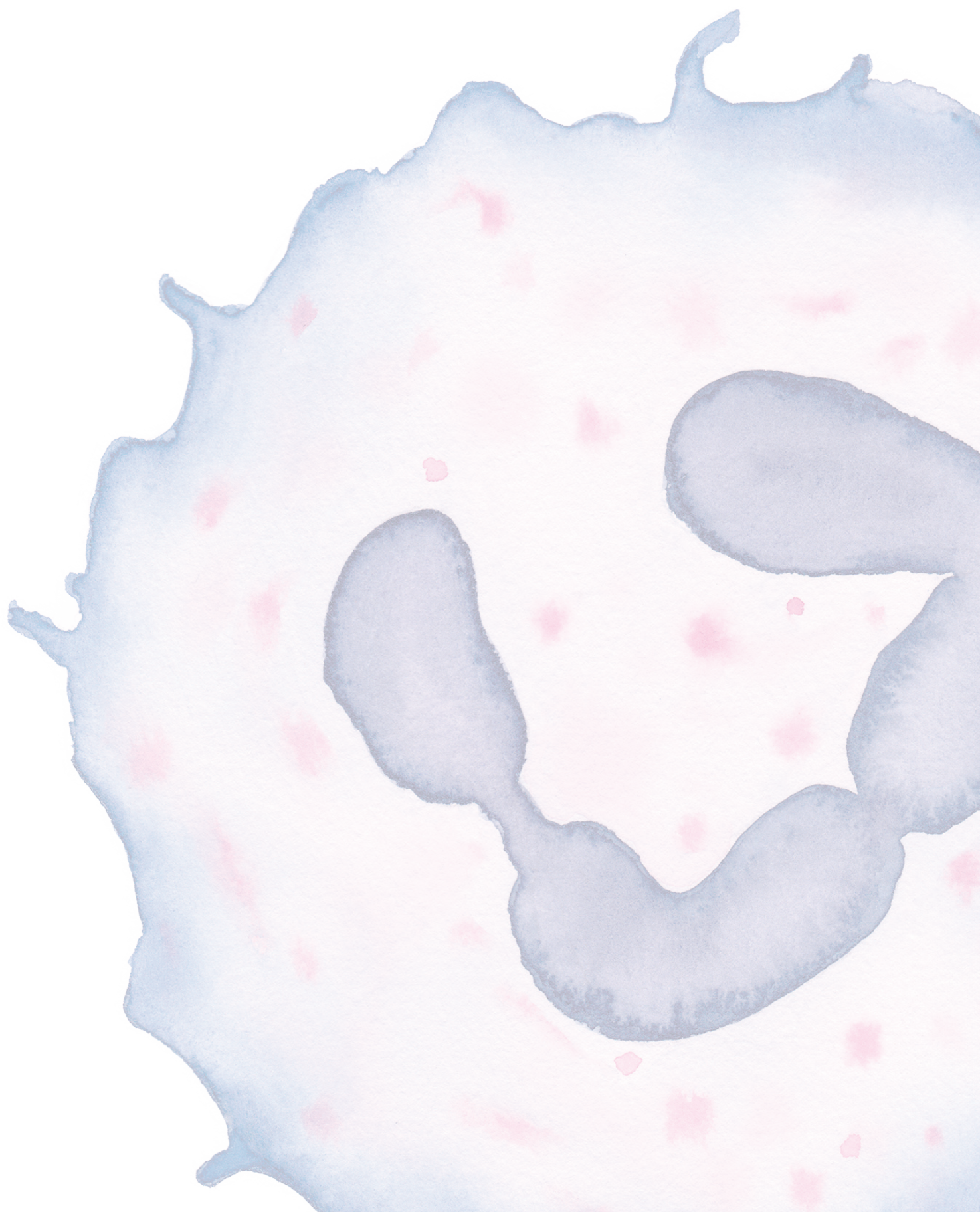
- Ussov, W.Y. et al., 2009. Granulocyte margination in bone marrow: comparison with margination in the spleen and liver. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 55(1), pp.87–96. Disponible en: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/00365519509075382>.
- Vicente, R. et al., 2016. Cellular senescence impact on immune cell fate and function. *Aging Cell*, 15(3), pp.400–406. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1111/accel.12455>.
- Vietinghoff, S. von & Ley, K., 2008. Homeostatic regulation of blood neutrophil counts. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 181(8), pp.5183–5188. Disponible en: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/eflink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=18832668&retmode=ref&cmd=prlinks>.
- Vietinghoff, S. von & Ley, K., 2008. Homeostatic Regulation of Blood Neutrophil Counts. *The Journal of Immunology*, 181(8), pp.5183–5188. Disponible en: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.181.8.5183>.
- Villa, P. et al., 2007. The interleukin-8 (IL-8/CXCL8) receptor inhibitor reparixin improves neurological deficits and reduces long-term inflammation in permanent and transient cerebral ischemia in rats. *Mol Med*, 13(3), pp.125–133. Disponible en: [http://www.molmed.org/content/pdfstore/125\\_133.Villa.00008.PDF](http://www.molmed.org/content/pdfstore/125_133.Villa.00008.PDF).
- Vintersten, K. et al., 2004. Mouse in red: Red fluorescent protein expression in mouse ES cells, embryos, and adult animals. *genesis*, 40(4), pp.241–246. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1002/gene.20095>.
- Voisin, M.-B. & Nourshargh, S., 2013. Neutrophil transmigration: emergence of an adhesive cascade within venular walls. *Journal of Innate Immunity*, 5(4), pp.336–347. Disponible en: <http://www.karger.com/Article/FullText/346659>.
- Weinbaum, S., Tarbell, J.M. & Damiano, E.R., 2007. The Structure and Function of the Endothelial Glycocalyx Layer. *dx.doi.org*, 9(1), pp.121–167. Disponible en: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.bioeng.9.060906.151959>.
- Weiss, L., 1970. Transmural cellular passage in vascular sinuses of rat bone marrow. *Blood*, 36(2), pp.189–208. Disponible en: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/eflink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=5427454&retmode=ref&cmd=prlinks>.
- Weiss, S.J., 1989. Tissue destruction by neutrophils. *New England Journal of Medicine*, 320(6), pp.365–376. Disponible en: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/eflink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=2536474&retmode=ref&cmd=prlinks>.
- Welsh, D.K. et al., 1995. Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron*, 14(4), pp.697–706. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0896627395902147>.
- Whyte, M.K. et al., 1993. Impairment of function in aging neutrophils is associated with apoptosis. *The Journal of Immunology*, 150(11), pp.5124–5134. Disponible en: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/eflink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=8388425&retmode=ref&cmd=prlinks>.
- Williams, M.R. et al., 2011. Emerging mechanisms of neutrophil recruitment across endothelium. *Trends in immunology*, 32(10), pp.461–469. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2011.06.009>.
- Wintrobe, M.M. & Greer, J.P., 2009. Wintrobe's clinical hematology. Disponible en: <http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=68enzUD7BVgC&oi=fnd&pg=PR23&dq=Wintrobe's+Clinical+Hematology&ots=fFKSkEZjVy&sig=GwUOdUmxgDuK0Zx8DoRhn6vr3qw>.
- Wong, K. et al., 2006. Neutrophil polarization: spatiotemporal dynamics of RhoA activity support a self-organizing mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(10), pp.3639–3644. Disponible en: <http://www.pnas.org/content/103/10/3639.full>.
- Woodfin, A. et al., 2009. Endothelial cell activation leads to neutrophil transmigration as supported by the sequential roles of ICAM-2, JAM-A, and PECAM-1. *Blood*, 113(24), pp.6246–6257. Disponible en: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2008-11-188375>.
- Wright, D.E. et al., 2001. Physiological Migration of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Science (New York, N.Y.)*, 294(5548), pp.1933–1936. Disponible en: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1064081>.

- Yago, T. et al., 2010. E-selectin engages PSGL-1 and CD44 through a common signaling pathway to induce integrin  $\alpha\text{L}\beta 2$ -mediated slow leukocyte rolling. *Blood*, 116(3), pp.485–494. Disponible en: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2009-12-259556>.
- Yipp, B.G. & Kubes, P., 2013. NETosis: how vital is it? *Blood*, 122(16), pp.2784–2794. Disponible en: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2013-04-457671>.
- Yu, X. et al., 2013. TH17 cell differentiation is regulated by the circadian clock. *Science (New York, N.Y.)*, 342(6159), pp.727–730. Disponible en: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1243884>.
- Zernecke, A. et al., 2008. Protective Role of CXC Receptor 4/CXC Ligand 12 Unveils the Importance of Neutrophils in Atherosclerosis. *Circulation Research*, 102(2), pp.209–217. Disponible en: <http://circres.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/CIRCRESAHA.107.160697>.
- Zhang, D. et al., 2015. Neutrophil ageing is regulated by the microbiome. *Nature*, 525(7570), pp.528–532. Disponible en: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=26374999&retmode=ref&cmd=prlinks>.
- Zhang, D.E. et al., 1997. Absence of granulocyte colony-stimulating factor signaling and neutrophil development in CCAAT enhancer binding protein alpha-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(2), pp.569–574. Disponible en: [/pmc/articles/PMC19554/?report=abstract](http://pmc/articles/PMC19554/?report=abstract).
- Zhan, Y. et al., 1998. Essential roles for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and G-CSF in the sustained hematopoietic response of *Listeria monocytogenes*-infected mice. *Blood*, 91(3), pp.863–869. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0966842X94906289>.





## 9. Anexos





## 9.1. Abreviaturas

- ADN:** ácido desoxirribonucleico
- AMI:** infarto de miocardio agudo
- ANOVA:** análisis de la varianza
- ARN:** ácido ribonucleico
- BrdU:** 5-bromo-2-desoxiuridina
- BSA:** albúmina de suero bovino
- CAR:** células reticulares abundantes en CXCL12
- CD:** clúster de diferenciación
- cDNA:** ADN complementario
- CD62L:** selectina L
- CFU:** unidad formadora de colonias en cultivo
- CLP:** ligación y perforación cecal
- CMP:** progenitor mieloide común
- CXCL:** ligando de quimioquina tipo CXC
- CXCR:** receptor de quimioquina tipo CXC
- DAMP:** patrones moleculares asociados a daño
- DAPI:** 4',6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato
- DMSO:** dimetil sulfóxido
- ELISA:** ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
- FBS:** suero fetal bovino

- G-CSF:** factor estimulador de colonias de macrófagos
- GFP:** proteína verde fluorescente
- GM-CSF:** factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos
- GPCR:** receptor acoplado a proteínas G
- HRP:** peroxidasa de rábano
- HSC:** célula madre hematopoyética
- HSPC:** célula madre y progenitor hematopoyético
- IL:** interleuquina
- LAD:** deficiencia de adhesión leucocitaria
- LPS:** lipopolisacárido (endotoxina)
- LXR:** receptores hepáticos X
- MPO:** mieloperoxidasa
- NET:** trampa extracelular del neutrófilo
- NK:** células asesinas naturales
- PAMP:** patrones moleculares asociados a patógenos
- PBS:** tampón fosfato alcalino
- PCA:** análisis de componentes principales
- PCR:** reacción en cadena de la polimerasa
- PFA:** paraformaldehído
- PRR:** receptores de reconocimiento de patrones
- qPCR:** PCR cuantitativa
- ROS:** especies reactivas de oxígeno
- RPMI:** medio de cultivo desarrollado en el Roswell Park Memorial Institute
- SDF-1:** nomenclatura anterior para CXCL12
- SDS:** dodecilsulfato sódico
- TLR:** familia de receptores de tipo Toll
- TNF:** factor de necrosis tumoral
- TRALI:** daño pulmonar agudo relacionado con transfusión
- WHIM:** síndrome WHIM (verrugas, hipogammaglobulinemia, infecciones y mielocatexis)
- WT:** *wild type*, ratones tipo silvestre
- ZT:** *zeitgeber time*, tiempo tras un estímulo sincronizador de ritmos circadianos

## 9.2. Publicaciones

1. Sreeramkumar, V., **Adrover, J. M.**, Ballesteros, I., Cuartero, M. I., Rossaint, J., Bilbao, I., Nácher, M., Pitaval, C., Radovanovic, I., Fukui, Y., McEver, R. P., Filippi, M.-D., Lizasoain, I., Ruiz-Cabello, J., Zarbock, A., Moro, M. A. & Hidalgo, A. Neutrophils scan for activated platelets to initiate inflammation. *Science* 346, 1234-1238 (2014).
2. **Adrover, J. M.** & Hidalgo, A. Visión de autor: Neutrophils scan for activated platelets to initiate inflammation. *Inmunología, publicación oficial de la Sociedad Española de Inmunología* 30, 21-22 (2015).
3. **Adrover, J. M.** & Hidalgo, A. Activated platelets jam up the plaque. *Circulation Research* 116, 557-559 (2015).
4. **Adrover, J. M.**, Nicolás-Ávila, J. A. & Hidalgo, A. Aging: A Temporal Dimension for Neutrophils. *Trends Immunol.* (2016). doi:10.1016/j.it.2016.03.005
5. Chong, S. Z., Evrard, M., Devi, S., Chen, J., Lim, J. Y., See, P., Zhang, Y., **Adrover, J. M.**, Lee, B., Tan, L., Li, J. L. Y., Liong, K. H., Phua, C., Balachander, A., Boey, A., Liebl, D., Tan, S. M., Chan, J. K. Y., Balabanian, K., Harris, J. E., Bianchini, M., Weber, C., Duchene, J., Lum, J., Poidinger, M., Chen, Q., Renia, L., Wang, C.-I., Larbi, A., Randolph, G. J., Weninger, W., Looney, M. R., Krummel, M. F., Biswas, S. K., Ginhoux, F., Hidalgo, A., Bachelier, F. & Ng, L. G. CXCR4 identifies transitional bone marrow pre-monocytes that replenish the mature monocyte pool for peripheral responses. *J. Exp. Med.* 213, 2293-2314 (2016).
6. Nicolás-Ávila, J. Á., **Adrover, J. M.** & Hidalgo, A. Neutrophils in Homeostasis, Immunity, and Cancer. *Immunity* 46, 15-28 (2017).

El grueso de los datos presentados en este trabajo se encuentra actualmente en proceso de revisión en la revista *Science*. Adicionalmente, dos artículos más en los que colabora el autor de esta tesis doctoral se encuentran en proceso de publicación.



### 9.3. Rutas bioquímicas diferencialmente expresadas entre ZT5 y ZT13

Incluimos aquí un listado de todas las rutas bioquímicas diferencialmente expresadas en neutrófilos frescos (ZT13) y envejecidos (ZT5). Se incluye con los nombres de las rutas metabólicas en inglés para facilitar la localización de las moléculas asociadas a dicha ruta por medio del nombre tal como aparece en la base de datos del IPA (*Ingenuity Pathway Analysis*). El parámetro *ratio* (proporción) informa del número de genes diferencialmente expresados de nuestra secuenciación que corresponden a esa ruta bioquímica dividido por el número total de genes que conforman la ruta.

Ruta bioquímica	-Log(pvalue)	Ratio
EIF2 Signaling	16,60	0,23
B Cell Receptor Signaling	12,10	0,20
iCOS-iCOSL Signaling in T Helper Cells	10,20	0,23
PKC $\theta$ Signaling in T Lymphocytes	9,37	0,21
Role of NFAT in Regulation of the Immune Response	8,36	0,17
Regulation of eIF4 and p70S6K Signaling	8,08	0,18
B Cell Development	7,62	0,36
mTOR Signaling	7,51	0,16
PI3K Signaling in B Lymphocytes	7,31	0,18
Altered T Cell and B Cell Signaling in Rheumatoid Arthritis	6,68	0,21

<b>Ruta bioquímica</b>	<b>-Log(pvalue)</b>	<b>Ratio</b>
IL-4 Signaling	6,27	0,21
Role of NFAT in Cardiac Hypertrophy	6,19	0,15
NF-κB Signaling	5,98	0,15
Chronic Myeloid Leukemia Signaling	5,63	0,18
HGF Signaling	5,50	0,17
T Cell Receptor Signaling	5,37	0,18
CD28 Signaling in T Helper Cells	5,35	0,16
Renin-Angiotensin Signaling	5,26	0,17
Calcium-induced T Lymphocyte Apoptosis	4,96	0,20
SAPK/JNK Signaling	4,92	0,17
EGF Signaling	4,87	0,21
Primary Immunodeficiency Signaling	4,81	0,23
Dendritic Cell Maturation	4,73	0,13
FcγRIIB Signaling in B Lymphocytes	4,68	0,24
IL-3 Signaling	4,45	0,18
T Helper Cell Differentiation	4,45	0,18
GM-CSF Signaling	4,40	0,19
Role of JAK1 and JAK3 in γc Cytokine Signaling	4,40	0,19
IL-2 Signaling	4,38	0,21
NF-κB Activation by Viruses	4,32	0,18
IL-6 Signaling	4,31	0,15
Type II Diabetes Mellitus Signaling	4,31	0,15
MSP-RON Signaling Pathway	4,21	0,22
CD40 Signaling	4,19	0,19
fMLP Signaling in Neutrophils	4,15	0,15
ErbB2-ErbB3 Signaling	4,07	0,19
Docosahexaenoic Acid (DHA) Signaling	4,06	0,23
Ephrin A Signaling	4,05	0,21
RANK Signaling in Osteoclasts	4,05	0,16
Telomerase Signaling	4,04	0,15
Colorectal Cancer Metastasis Signaling	4,01	0,11

<b>Ruta bioquímica</b>	<b>-Log(pvalue)</b>	<b>Ratio</b>
Cardiac Hypertrophy Signaling	4,00	0,11
Acute Myeloid Leukemia Signaling	3,95	0,17
Reelin Signaling in Neurons	3,95	0,17
PEDF Signaling	3,81	0,17
Melanoma Signaling	3,80	0,21
CXCR4 Signaling	3,79	0,13
Endometrial Cancer Signaling	3,74	0,19
IL-9 Signaling	3,73	0,24
Gα12/13 Signaling	3,73	0,14
GNRH Signaling	3,73	0,13
Production of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in Macrophages	3,70	0,12
NGF Signaling	3,66	0,14
p70S6K Signaling	3,65	0,13
Lymphotoxin β Receptor Signaling	3,60	0,19
Molecular Mechanisms of Cancer	3,59	0,09
Phospholipase C Signaling	3,58	0,11
phagosome formation	3,57	0,14
Non-Small Cell Lung Cancer Signaling	3,54	0,17
Role of Macrophages, Fibroblasts and Endothelial Cells in Rheumatoid Arthritis	3,51	0,10
Angiopoietin Signaling	3,48	0,17
Nitric Oxide Signaling in the Cardiovascular System	3,45	0,14
Nur77 Signaling in T Lymphocytes	3,40	0,18
Macropinocytosis Signaling	3,37	0,16
RAR Activation	3,37	0,11
Thrombin Signaling	3,37	0,11
Myc Mediated Apoptosis Signaling	3,34	0,17
Role of p14/p19ARF in Tumor Suppression	3,30	0,23
Rac Signaling	3,27	0,14
Fcγ Receptor-mediated Phagocytosis in Macrophages and Monocytes	3,23	0,14
Gap Junction Signaling	3,23	0,12

<b>Ruta bioquímica</b>	<b>-Log(pvalue)</b>	<b>Ratio</b>
Prostate Cancer Signaling	3,21	0,15
Renal Cell Carcinoma Signaling	3,20	0,16
P2Y Purigenic Receptor Signaling Pathway	3,15	0,13
IL-8 Signaling	3,15	0,11
Insulin Receptor Signaling	3,14	0,12
Melanocyte Development and Pigmentation Signaling	3,11	0,14
LPS-stimulated MAPK Signaling	3,10	0,15
CNTF Signaling	3,07	0,17
IGF-1 Signaling	3,06	0,13
Gαq Signaling	3,06	0,12
FLT3 Signaling in Hematopoietic Progenitor Cells	3,05	0,15
Leptin Signaling in Obesity	3,05	0,15
Glioma Signaling	3,02	0,13
Role of Tissue Factor in Cancer	3,02	0,13
HER-2 Signaling in Breast Cancer	2,95	0,15
Breast Cancer Regulation by Stathmin1	2,95	0,11
PDGF Signaling	2,90	0,14
Thrombopoietin Signaling	2,89	0,16
Virus Entry via Endocytic Pathways	2,89	0,14
Erythropoietin Signaling	2,83	0,15
Hereditary Breast Cancer Signaling	2,79	0,12
GDNF Family Ligand-Receptor Interactions	2,78	0,15
Ceramide Signaling	2,76	0,14
Autoimmune Thyroid Disease Signaling	2,74	0,17
CREB Signaling in Neurons	2,74	0,11
Antigen Presentation Pathway	2,73	0,19
PTEN Signaling	2,73	0,12
Clathrin-mediated Endocytosis Signaling	2,73	0,10
PPAR Signaling	2,72	0,13
Xenobiotic Metabolism Signaling	2,72	0,09
Graft-versus-Host Disease Signaling	2,68	0,17

<b>Ruta bioquímica</b>	<b>-Log(pvalue)</b>	<b>Ratio</b>
Glioblastoma Multiforme Signaling	2,67	0,11
IL-12 Signaling and Production in Macrophages	2,66	0,11
Glucocorticoid Receptor Signaling	2,65	0,09
Fc Epsilon RI Signaling	2,63	0,12
ErbB4 Signaling	2,62	0,15
LXR/RXR Activation	2,62	0,12
JAK/Stat Signaling	2,59	0,14
Role of Osteoblasts, Osteoclasts and Chondrocytes in Rheumatoid Arthritis	2,59	0,10
Signaling by Rho Family GTPases	2,58	0,09
Natural Killer Cell Signaling	2,56	0,12
FGF Signaling	2,55	0,13
TR/RXR Activation	2,55	0,13
AMPK Signaling	2,54	0,10
PPAR $\alpha$ /RXR $\alpha$ Activation	2,54	0,10
p53 Signaling	2,53	0,12
Role of Pattern Recognition Receptors in Recognition of Bacteria and Viruses	2,49	0,11
NRF2-mediated Oxidative Stress Response	2,49	0,10
Estrogen-Dependent Breast Cancer Signaling	2,47	0,14
IL-15 Signaling	2,47	0,14
Role of PI3K/AKT Signaling in the Pathogenesis of Influenza	2,47	0,14
UVA-Induced MAPK Signaling	2,43	0,13
DNA Double-Strand Break Repair by Non-Homologous End Joining	2,42	0,29
Cell Cycle: G1/S Checkpoint Regulation	2,42	0,14
IL-17A Signaling in Airway Cells	2,42	0,14
VEGF Family Ligand-Receptor Interactions	2,42	0,13
G-Protein Coupled Receptor Signaling	2,42	0,09
Acute Phase Response Signaling	2,41	0,10
UVB-Induced MAPK Signaling	2,40	0,15
Leukocyte Extravasation Signaling	2,40	0,10
Systemic Lupus Erythematosus Signaling	2,37	0,09



<b>Ruta bioquímica</b>	<b>-Log(pvalue)</b>	<b>Ratio</b>
Tec Kinase Signaling	2,36	0,10
Huntington's Disease Signaling	2,36	0,09
CCR3 Signaling in Eosinophils	2,32	0,11
Regulation of IL-2 Expression in Activated and Anergic T Lymphocytes	2,30	0,13
Neurotrophin/TRK Signaling	2,29	0,13
Germ Cell-Sertoli Cell Junction Signaling	2,28	0,10
IL-10 Signaling	2,24	0,13
HMGB1 Signaling	2,23	0,11
Glioma Invasiveness Signaling	2,20	0,14
Growth Hormone Signaling	2,20	0,13
GPCR-Mediated Integration of Enteroendocrine Signaling Exemplified by an L Cell	2,12	0,13
Small Cell Lung Cancer Signaling	2,12	0,13
Aldosterone Signaling in Epithelial Cells	2,12	0,10
Superpathway of Geranylgeranyldiphosphate Biosynthesis I (via Mevalonate)	2,09	0,24
Prolactin Signaling	2,04	0,12
ErbB Signaling	2,04	0,12
Toll-like Receptor Signaling	2,01	0,12
Neuropathic Pain Signaling In Dorsal Horn Neurons	2,01	0,11
eNOS Signaling	2,01	0,10
Mitochondrial Dysfunction	2,01	0,09
Endothelin-1 Signaling	1,98	0,09
ERK/MAPK Signaling	1,98	0,09
TREM1 Signaling	1,97	0,12
Antiproliferative Role of Somatostatin Receptor 2	1,94	0,13
Communication between Innate and Adaptive Immune Cells	1,94	0,11
PAK Signaling	1,94	0,11
CD27 Signaling in Lymphocytes	1,89	0,14
Acetate Conversion to Acetyl-CoA	1,87	0,50
IL-1 Signaling	1,87	0,11
Death Receptor Signaling	1,84	0,11

<b>Ruta bioquímica</b>	<b>-Log(pvalue)</b>	<b>Ratio</b>
VEGF Signaling	1,84	0,11
Pancreatic Adenocarcinoma Signaling	1,84	0,10
Relaxin Signaling	1,82	0,10
Role of IL-17A in Arthritis	1,81	0,13
Mouse Embryonic Stem Cell Pluripotency	1,75	0,11
Oxidative Phosphorylation	1,75	0,10
Sphingosine-1-phosphate Signaling	1,75	0,10
Actin Cytoskeleton Signaling	1,71	0,08
Mevalonate Pathway I	1,64	0,23
Cholecystokinin/Gastrin-mediated Signaling	1,59	0,10
FAK Signaling	1,58	0,10
$\alpha$ -Adrenergic Signaling	1,58	0,10
Ethanol Degradation II	1,57	0,14
Colanic Acid Building Blocks Biosynthesis	1,55	0,21
Selenocysteine Biosynthesis II (Archaea and Eukaryotes)	1,50	0,33
Thioredoxin Pathway	1,50	0,33
ERK5 Signaling	1,47	0,11
April Mediated Signaling	1,44	0,13
VDR/RXR Activation	1,44	0,10
Regulation of the Epithelial-Mesenchymal Transition Pathway	1,43	0,08
Salvage Pathways of Pyrimidine Ribonucleotides	1,42	0,10
PI3K/AKT Signaling	1,41	0,09
Granzyme B Signaling	1,39	0,19
Atherosclerosis Signaling	1,39	0,09
PXR/RXR Activation	1,38	0,11
3-phosphoinositide Biosynthesis	1,37	0,08
B Cell Activating Factor Signaling	1,35	0,13
Superpathway of Cholesterol Biosynthesis	1,34	0,14
Corticotropin Releasing Hormone Signaling	1,34	0,09
Role of NANOG in Mammalian Embryonic Stem Cell Pluripotency	1,34	0,09
Unfolded protein response	1,32	0,11

Ruta bioquímica	-Log(pvalue)	Ratio
2-amino-3-carboxymuconate Semialdehyde Degradation to Glutaryl-CoA	1,31	1,00

**Tabla 5: Rutas bioquímicas diferencialmente expresadas** en neutrófilos frescos (ZT13) y envejecidos (ZT5) obtenida mediante el software IPA.

## 9.4. Huella transcriptómica de neutrófilos frescos y envejecidos

Listado de los genes regulados al alza de manera coherente en todas las condiciones de los experimentos de secuenciación masiva de neutrófilos frescos (ZT13, CXCR2<sup>ΔN</sup>, Bmal1<sup>ΔN</sup>) y envejecidos (ZT5, CXCR4<sup>ΔN</sup>) en análisis de agrupamiento (*k-means*).

### REGULADOS AL ALZA EN NEUTRÓFILOS FRESCOS

*Zfp87, Rnf41, Dock4, Nrgn, Pvt1, Zfp341, Abcf3, Irf1, Sfxn4, Gm26819, Atp5b, Fnip1, Nt5dc3, Gm26581, Prpf4, Ankrd13d, Rab32, Gsdmcl-ps, Peak1os, Plk4, Fam65b, Atrnl1, Gm26624, Gm128, Fxyd5, Sept3, Mybpc3, 5430416N02Rik, Smad7, Mgat5, Klf2, BC051077, Syt11, Atp5e, Mefv, Zfp715, Kctd12, Tmem70, Tmem260, Sec23ip, C430042M11Rik, Fgfr1op, Smurf2, Maoa, Nelfcd, Mr-gprc2-ps, Clk1, P2ry12, Mta3, C920009B18Rik, Marcks, Slc25a30, Dtd1, Igf2r, Scmh1, Itm2c, C530008M17Rik, Cnot10, 2310001H17Rik, Klhl21, Zhx1, Bst1, Zzz3, Mnt, Asb1, Btg1, Tgoln1, Mkrn2, Gm15370, Nudt16l1, Nipa2, Bzw1, Alox12, Slc35f5, Fxyd7, Cebpb, Dhx40, Gm15472, Atg3, 1700088E04Rik, Gm4425, Abhd15, Cdc42bpa, Papd5, Pign, Ifngr1, Gm13068, Lnpep, Mettl20, 2010110K18Rik, Tspan33, Pip4k2a, Prodh2, Retsat, Ppp2ca, Gm16578, Tcp11l1, Basp1, Wdr33, Slc39a13, Golga1, Zdhhc9, Ier5, 4921536K21Rik, Gm6410, Man-ba, Minos1, Tmem234, Rpl3l, Prkcq, Fer1l6, Nfil3, Nadk2, Gm26677, Pdz-k1ip1, Gm10172, Batf, Ccdc97, Mastl, Clic4, Atp5sl, Fam21, Myo9b, Slc30a9, Fign, 1810058I24Rik, Ranbp2, Neb, Arid5a, Uxs1, Rps6ka4, Nat9, Aga, Brms1, Gm21738, Dusp3, March7, Phc3, Fam173a, Coq10b, Adamtsl4, Mre11a, Gm3755, Ptgfrn, Mmd, Sfa2, Inf2, Mex3b, Vps16, Npc2, Trf, Rian, Gpn3, Ssbp2, Eif3j1, Themis2, Tspan7, Acot7, Fam213a, Frrs1, Med25, Hp, Stat5a, Snap23,*

3110057O12Rik, *Osm*, *Malsu1*, *Etf1*, *Hist1b1c*, *Arrb1*, *Reep6*, *Zfp324*, *Zfp106*, *Aim2*, *Naa38*, *Anapc15*, *Nars*, 2410004B18Rik, *Map2k3*, *Zc3h12a*, *Gab2*, *Chac1*, *Rara*, *Rpl11*, *Cdr2*, *Slc16a3*, *Tmem156*, 2310003H01Rik, *Appbp2os*, *Aqp1*, *Bcl2l11*, *Kdm1b*, *Arhgef12*, *Gla*, *Zfp282*, *Tlcd2*, *Cenpa*, E030030I06Rik, *Polr2a*, *Car2*, *Plekhg6*, 1500035N22Rik, *Rcn2*, *Stk17b*, *Ppp1r15a*, *Tgfb1*, *Trappc6a*, *Cic*, *Rpn2*, *Mylip*, *Grb2*, *Acs13*, *Atp2b4*, *Creg1*, *Mical2*, *Fuca2*, *Tnfrsf14*, *Ncoa3*, *Mlxip*, BC002059, *Piwi12*, *Sell*, *Rnf149*, *Pptc7*, *Pde8a*, *Napa*, *Tnik*, *Txnip*, *Slc35e3*, *Camk1d*, *Atf3*, *Slc35e4*, *Entpd1*, *Bai3*, *Slc4a1*, *Dcun1d1*, *Prr3*, *Nr1h2*, *Uhrf1bp1*, *Cytip*, *Rps18-ps3*, *Spock3*, *Haus8*, *Homer1*, *Rab33b*, *Mcl1*, *Fnip2*, *Alx4*, *Stard7*, *Nrf1*, C78339, *Polr3k*, *Bcl2l1*, *Mfsd1*, *Arfrp1*, *Rpl21-ps8*, *Ddx24*, *Il1b*, *Gm10720*, *Pex11g*, *Gm16503*, *Relt*, 4930579G24Rik, *Gcnt1*, *Rbak*, *Tpp2*, *Maz*, *Skint8*, *Gm14340*, C030017D09Rik, *Ubc*, *Ccn11*, *Garnl3*, *Lilrb4*, *Zfp36*, *Pus7l*, *Gm2673*, *Gm16210*, 9330159M07Rik, *Slc3a2*, *Ecm1*, *Cnst*, *Csprs*, *Slc39a4*, *Vav1*, A730081D07Rik, *Gm26518*, *Gm2a*, *Kansl3*, *Spata1*, *Zc3hc1*, B230325K18Rik, *Cnnm2*, *Iqsec1*, *Shprh*, *Cnot11*, *Cog4*, *Odc1*, *Ccne2*, *Polg*, *Prpf38a*, *Mcc*, *Csgaln-act1*, *Gm26686*, *Pde6a*, *Eea1*, *Tubb1*, *Anp32b*, *Metrn1*, *Mtx1*, *C5ar2*, *Ttyh3*, *Ell2*, *Ctsk*, *Zfp236*, *Ctsz*, *Erp44*, *Fndc3b*, *Ipo7*, *Kat2b*, *Ttc7*, *Ergic1*, *Rasa3*, *Slco1a6*, *Rab11fip4*, *Slc44a1*, *Picalm*, 4931406P16Rik, *Fosb*, *Bicd2*, *Pkn2*, *Hsbp1*, *Kdm5a*, *Wsb1*, *Clta*, *Wdr17*, *Gm5113*, *Coro1c*, *Bpgm*, *Ndr1*, *Cd200r3*, *Foxq1*, *Dbn1d2*, *Laptm5*, *Prpf18*, *Tmem167b*, *Tjap1*, *Wdr89*, *Casq1*, *Elf2*, AF251705, *Ghdc*, *Slc2a1*, *Gm7488*, *Msto1*, *Il13ra1*, *Zfp740*, *Uchl5*, *Arrdc4*, *Vmp1*, *Mrps15*, *Ypel5*, *Hba-a2*, *Slc36a1*, *Adam17*, *Emb*, *Zfp52*, *Trove2*, *Epb4.1*, *Fgl2*, *Map3k5*, *Tspan13*, *Maf*, *Tnfrsf10b*, *Klhl5*, *Abi3*, *Polr2b*, *Zfp292*, *Nt5dc2*, *Pdxdc1*, *Blcap*, *Pnpla2*, *Maml3*, *Acadvl*, *Ppbbp*, *Dtx4*, 1500011B03Rik, *Sik1*, H2-D1, *Slc40a1*, *Gm15718*, *Sirt1*, *Pf4*, *Slc7a5*, *Lrrc61*, *Fth1*, *Clec7a*, *Tpd52*, *Gm15396*, *Sgpl1*, *Rsrc2*, *Alkbh3*, E330020D12Rik, *Acbd5*, *Slc48a1*, *Fbxw7*, *Gm3650*, *Tbc1d15*, *Scarb2*, *Cul9*, *Cep76*, *Vps39*, *Gm12216*, *Dnaja1*, *Slc9a3r2*, *Ap3d1*, *Fam168a*, *Wdr47*, *Nbeal1*, *Cd93*, *Cd101*, *Pde4b*, *Prkra*, *Txnrd1*, *Lfng*, *Blrb*, *Btbd19*, *Cpt2*, *Ppp1r18os*, *Rheb*, *Abhd1*, *Xpo1*, *Gcc1*, *St8sia4*, *Dda1*, *Zranb1*, E230013L22Rik, *Plbd2*, *Tgfb1*, *Nudcd2*, *Mkrn1*, *Mettl18*, *Etoh1*, *Gtf2e2*, *Gm16973*, *Dnajb13*, *Rnf185*, *Btg2*, *Isy1*, *Cir1*, *Fam65c*, *Tgfb2*, *Gm26809*, *Mau2*, *Fyb*, *Xbp1*, *Cnbp*, *Bend6*, *Ctla2b*, *Man1b1*, *Gm5269*, *Prkar2a*, *Coa5*, *Pctp*, *Uba3*, *Slc35e2*, 5430417L22Rik, *Fam168b*, *Klf6*, *P2ry2*, *Vamp4*, *Pum2*, *Clec1b*, *Trem1*, *Grem1*, *Bri3bp*, *Dgke*, *P2ry13*, *Nek6*, *Adcy3*, *Ybx3*, *Kdm7a*, 6030408B16Rik, *Rdh9*, *Susd2*, *Mgat2*, *Dolpp1*, *Ddx42*, *Il4ra*, *Maff*, *Ywhag*, *Armc9*, *Csf1*, A830010M20Rik, *Fuca1*, *Ern1*, *Atp6ap2*, *Alkbh5*, *Gm26258*, H2-Q10, *Ctsa*, 8030462N17Rik, 4933411K20Rik, *Nt5c*, *Irak1*, *Hecw2*, *Gm5150*, *Arfip1*, *Isyna1*, *F2r*, *Ccp1*, *Gga3*, *Galnt7*, *Foxo4*, *Nlrp12*, *Gm5380*, *Plek*, *Efcab5*, *Ptger4*, *Ube2o*, *Tpm4*, *Nhlrc3*, *Gm8923*, *Gm15333*, *Pex13*, *Gm15440*, *Tango6*, *Per1*, *Jak3*, *Adam30*, *March2*, *Gm14706*, *Jade2*, *Pde5a*, *Orai3*, *Vamp2*, *Nip7*, *Gpr146*, *Rps2-ps9*, E230016M11Rik, *Klhd2*, *Tas2r135*, *Med12l*, *Ppp2r3c*, *Birc3*, *Ctla2a*, *Gm15920*, 4933413C19Rik, *Pacs2*, *Whsc1*, *Abi1*, *Sptb*, *Ubash3b*, *Fam46c*, *Gm16061*, *Ugt1a7c*, *Twf1*, *Gm10025*, *Myadm*, *Glrx5*, *Kirrel3*, *Zbtb39*, *Gm15371*, 1700025N21Rik, *Rcan1*, *Skap2*, *Gm13589*, *Eif2s1*, *St3gal4*, *Isca1*, *Fam220a*, *Sirpb1b*, *Dusp1*, 1700112E06Rik, 9530026P05Rik, *Srsf5*, *Zpr1*, *Preb*, *Vmn1r-ps97*, *Lcp2*, *Phf1*, *Nfxl1*, *Prpf6*, *Rps6ka5*, *Tfdp2*, *Tnfrsf26*, *Gm12892*, *Il17ra*, *Cdc42bpg*, *Gm20538*, *Nudt4*, *Fos*, *Ptgs2*, *Cxcr4*, *Gm13800*, *Rdh13*, *Pfkfb4*, *Ppp2r3d*, *Tyms*, *Tnfaip2*, *Csrnp1*, *Hnrnpb2*, A730011C13Rik, 4931406B18Rik, *Gpcpd1*, *Gm10778*,



*Hnmt, Ankra2, Mobp, Tssc4, Gm16047, Tmem175, Gnass, Gm26755, Sdf4, Cab39l, Aste1, Zfp36l2, Gm13490, Rtn4ip1, Csf3r, Gosr1, Mtus2, Spata13, Apeh, 6330416G13Rik, C030013C21Rik, Frs2, Rpa2, Prpsap1, Slc9a9, Tsc22d1, Nlrp3, She, Gm11520, Rps6kb1, Clec4d, Glrx2, Hccs, Mtdh, D430042O09Rik, Bdh1, Kdm6bos, Gcnt2, Ift122, Srgn, Smim3, Ank, Srxn1, B3gntl1, 4833418N02Rik, Deptor, Zfp719, 4930451C15Rik, Cep131, Bcl6, Prr5l, Tmem164, Gm12840, Ccndbp1, Ppp4c, Ptpn2, Cited2, 4930562C15Rik, Clec1a, Rnf31, MacroD2os1, Ccr1, Pax1, Kpna4, Zmym6, Zfp263, Tbc1d4, Tctex1d4, 0610009E02Rik, Faf2, Hgsnat, Bag1, Neurl3, Iqcb1, Slc7a6os, Akap10, Eldr, Serpine2, Mapk1ip1, Eme1, Zfp637, Csad, Tmed7, Taf13, Gm16638, Rtf1, Tlk1, Tspyl4, Mmp27, Fhl1, Mzt1, Acap2, A830082K12Rik, Hmgcl, Hcar2, Dnttip2, Gm21833, Ivns1abp, Fem1c, Tmem202, 9230111E07Rik, Fam76a, Chrm3, Klcl3, Celf2, Cnpy3, Prrg3, Gpd1l, Gm25271, Dck, Dcaf5, Ssr2, Fam32a, Pim1, Zbtb1, Plekho2, Gm22334, Klra2, Adam10, Spidr, Pla2g7, Abcg1, Stard9, Rab11fip5, Gm16241, Asprv1, Smyd3, Gm1821, Wiz, Smchd1, Sfxn5, Tacstd2, Gm17083, Mga, 4930453N24Rik, Zbtb44, Sbds, Yipf4, Ccs, Cbr1, Hist2h4, Sppl2b, Ssbp3, Cd3eap, Hexdc, Pja2, Tmed8, Irf2bp2, Gm4707, Tbkbp1, Vsig10l, Nod2, Arih2, Mtpap, Golgb1, Kcnj16, Fancf, Tm7sf3, Rbm47, Pkn1, Gm12568, Ik, Slc25a37, Tlr6, Gm20400, Bcor, Sirpb1c, Gm6055, Gm9780, Rbm27, BC018507, Gnpda1, Gm10872, Ambra1, Selt, Wdfy1, Rmnd5b, Fech, Bmp2k, Hbb-bs, Smim17, Mpeg1, Gm16012, Gm13657, Ciao1, Lmnbl, Dbn1, Cherp, Gm3307, Gal3st3, Gm11261, A730060N03Rik, Bid, Csf1r, Colgalt1, Gan, Sirpb1a, Plekhm3, 9830144P21Rik, Gm21972, Ndufs2, Zfand5, Hrh2, Jun, Gm13237, Nrros, Gm24093, Gm26634, H13, Jak2, Mid1, Junb, 7530416G11Rik, Fbxo31, 4732487G21Rik, Crot, Adipor1, Trim8, Sbn02, Socs3, 9530052E02Rik, Arhgap24, Gm27045, Ctsd, Gpatch3, Alas2, Ythdc1, Aldh1a1, Gm26860, Eml1, 1500004A13Rik, Cd274, Bbs5.*

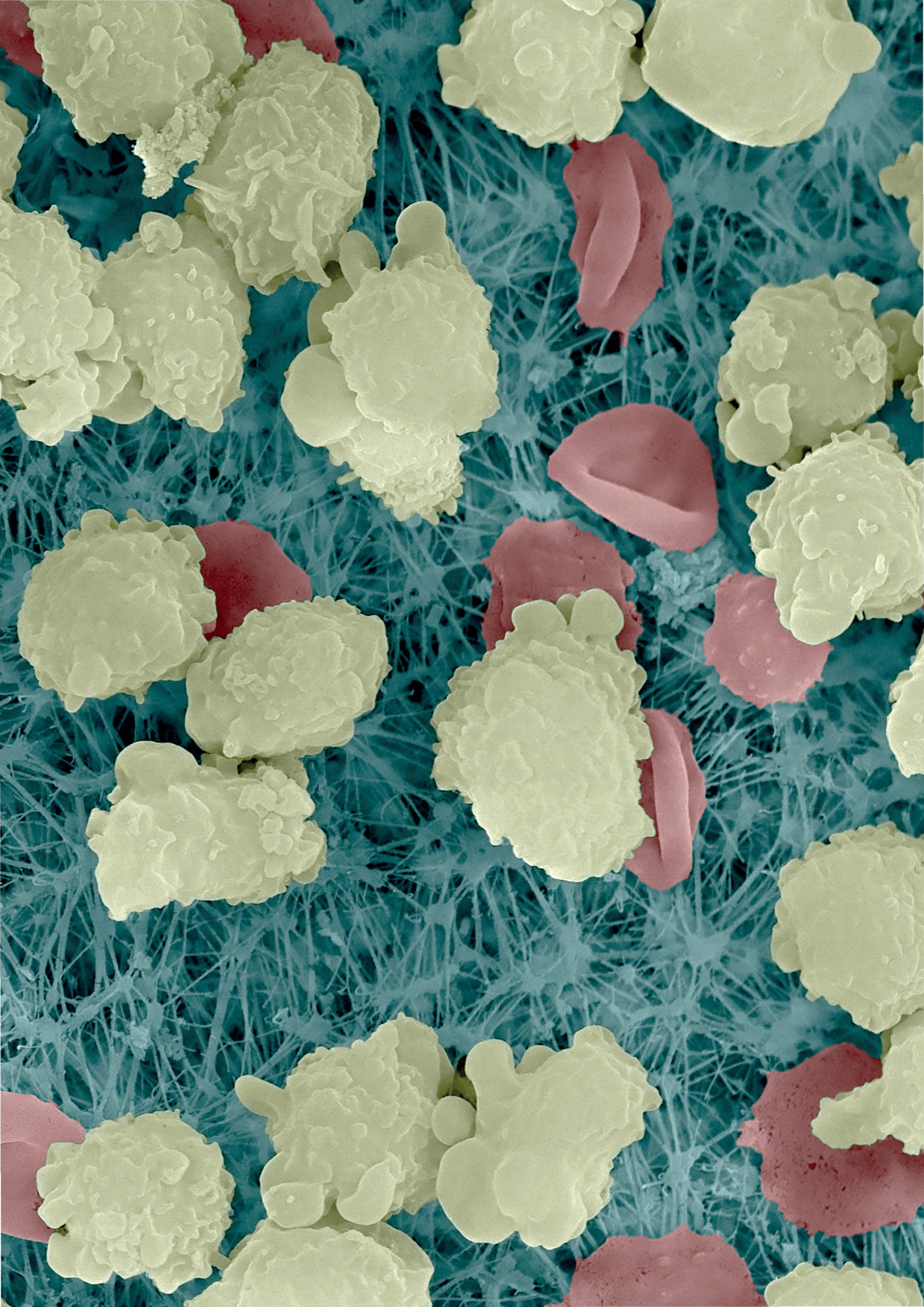
## REGULADOS AL ALZA EN NEUTRÓFILOS ENVEJECIDOS

*Smarchb1, Mrpl22, Nsun6, Prickle3, Ctbp1, Hs6st1, Lancl2, Gm13207, Pol-dip2, Wdr70, Cyp51, Cox11, Dars2, Pqbp1, Cep85, Tmem86b, Nsl1, Gm14414, Siae, Gm17634, Smo, Dcdc2c, Mrc1, Dynlt3, Atg14, Insig1, Tubb4a, Gm12034, Sdf2, Kdm5c, Arfgap3, Adap2, Rabgap1l, Sh3bgrl, BC030499, Akr1e1, Atp5g2, Gm14984, Hdac9, Gm9752, Ndufa9, Helz, 4930426L09Rik, Cstf2, Nme1, Spred2, Cfl2, Gm12079, Dlst, Eph4, Slc7a7, Blmh, Fam73b, Phka2, Rfx7, Slc16a5, Gm10123, Gm23887, Pex1, Gm26613, Oas1c, Luc7l3, Phf19, Zmym3, Phyhipl, Adra1a, Rpl27, Gm22988, Ctns, Ociad1, Myg1, Ankrd40, Psm14, Nsdhl, Ppm1k, Adamts6, Zkscan7, Gm25288, Ppp2r1a, Slc25a16, Zmat2, Ppp2r5e, Chrna1, Rbbp7, Gm4955, Pnma2, Klhdc3, 4930565N06Rik, Cdk9, Gm15174, Slc19a1, Trim9, Lpcat4, Zfp275, Smarce1, Slc25a23, Ap3s2, Foxd2os, Med23, Plrg1, Gtf2h4, Pigh, B230118H07Rik, Avpr2, Inpp4b, Gpat2, Alms1, 2210411M09Rik, Csrp2, Rars, Coasy, Nrde2, Depdc7, L1cam, Fam101a, Zfp319, Trerf1, Gm11795, Zkscan17, Zfp7, Chordc1, 0610007P14Rik, Fahd2a, Cd209a, 2700029M09Rik, Atp10d, Cenpj, Arhgap27os1, Amz2, Fam184a, Pwp1, Xrcc3, Tpx2, Arhgef7, Atp6v0a2, Slc39a3, mt-Rnr1, Lin52, Itsn2, Arfgap2, Kcnh6, Mcur1, Rae1, Cbr4,*

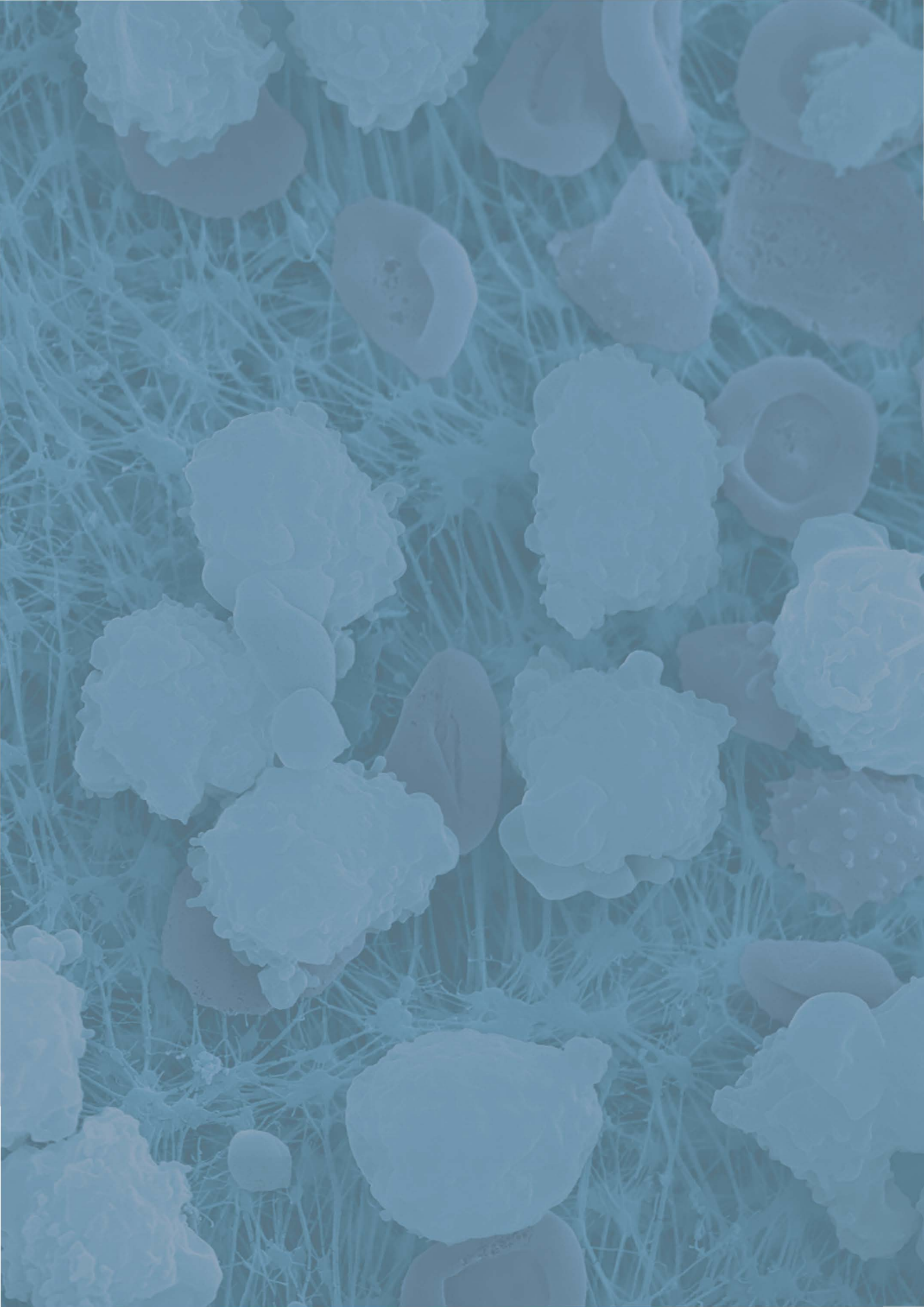
*Dexi, C2cd3, Gm22249, Gm13012, Gpr137b, Plod3, Nfix, Susd3, Helz2, Rbl2, Trappc11, Zfp768, Tmem42, Gm15597, Ppp3cb, 4931413K12Rik, Ap4e1, Ssr1, Raly, Itfg1, Gstp2, Atg16l2, Rps13-ps1, Gm15342, Tbc1d31, Socs4, Mdp1, Riok1, Rbl1, Babam1, Primpol, Kmt2d, Hes6, Gm13572, Mllt1, Gm15799, Golga2, Ddx46, Ppid, Fam96b, Pdss2, B330016D10Rik, Rps28, Gm7805, Yipf5, Ipo8, Scin, B4galt7, Etfldh, Cbfb, Trpm4, Fam212b, Hdac8, 9530046B11Rik, Incenp, Psmd13, Gtf2f1, Rasa1, Gstm4, Mtmr2, Lace1, Zbtb8b, A430093F15Rik, Rapgef4os3, Eif3m, Med6, Med10, Ddx20, Ankrd49, Ankrd35, 8430408G22Rik, Ccdc134, Gm15384, Gba2, Nab1, Lpcat1, Pmvk, Dcps, Gmds, Dcun1d3, Zfp120, Gm13620, Cc2d1b, Zfp959, Marveld2, Prss12, Il10ra, Cdc16, Zfp219, Phf11d, Gm13205, Slc4a2, Dvl3, Polk, Ppa2, Ddx6, Dennd2a, Ogfr, Gm608, Gm16157, Taf1c, Dlgap1, Hmgcr, Ctso, Vps11, Cdk19, Zfp260, Dok1, Gm17029, Bace1, Ddx23, Mtx3, Alpk1, Tmed1, Nup205, Gm12669, Zfp619, Isoc2a, Arap1, Etv3, Nln, Lmna, Smarca4, Smurf1, Htr1b, Gm5641, Gm15675, Psk, Ncstn, Psmd6, Lrba, Ldlr, Kif16b, Zfp672, Dazap1, Gm13840, Gpatch8, Wars2, Ecd, Polr3c, Zw10, 2610034B18Rik, Pgrmc2, Ahnak, A430108G06Rik, Cd276, Atn1, Mss51, Abcd3, Psm4, Chad, Zbtb26, Ssbp4, 4933426K07Rik, Mbnl3, Matk, Pnp, Tspan5, Mpi, L3mbtl3, Fam131a, Sp110, Gm15345, Abt1, Map2k1, Mipep, Nfkb1, Ube2q2, Rsad1, Tatdn1, Fv1, Gm16121, Commd2, Tmem242, Esd, Ctbs, Ctsh, Gpr126, Hist2h2bb, Fryl, Gm25266, Bcl9, Mri1, Ppp2r2a, Coq3, Fam96a, Sart1, Commd3, 6330408A02Rik, Mnd1-ps, Vasn, Csth, Adamdec1, Ccnc, Trip4, Gpatch2, Rpusd3, Camkmt, Galnt2, Btl9, Prkaca, Pabpn1, Pigo, Zfp949, Suw39h1, Zbtb22, Smim15, Mir17hg, Dmtf1, Eif4g2, Emc9, Hivep3, Crtap, Prrc2b, Ywhag, Ccdc78, Rbm12, Rnf214, Mthfd2, Cct5, Pomgnt1, Fbxl2, Rab3gap2, Spn, Gm10335, A530032D15Rik, Rexo1, Kit, Ywhaz, Eif4g3, Mon1a, Smarcal1, Zfp579, Ttc9c, Gm16133, Zbtb5, Cs, Srebf2, Khdrbs1, Atxn2l, Micu3, Rasal3, Tuba1a, Gm15662, Supt7l, Cd247, Fbxl6, Eif3i, Trib3, Asb6, Rexo4, Ear2, Gm16553, Gpr21, Apc, Ly6h, Gpn2, Alpk2, Ppp1r3f, Isoc2b, Gm10401, Gm15939, Tmem120b, Rcn1, Ntan1, Wasf2, Rasgrp2, Myo9a, Creb5, Uppt, Gm16244, Gapdhs, 1700037C18Rik, Mrpl40, Kcnab2, Gmppa, Fam149b, Lins, Pydc4, Snrpe, Hist1h2bq, Zbtb17, Zbtb20, Abcf2, Szt2, Zer1, Tmem248, Gm6086, Sox2ot, Zfp408, Eps15l1, Mina, Ube4b, Lpp, Slx4, Aldh7a1, Rpl31, Cox16, Gm15560, Tep1, Abcc5, Errfi1, Ipo13, Epg5, Mast1, Lmbrd1, Ube2d2a, BC046401, Med8, Eif4a2, Dffa, Qsox1, Rere, Fra10ac1, Exoc8, BC037034, Gm9727, Slc5a6, Atp5o, Orc5, Foxn3, Urb1, D130007C19Rik, Rbm15b, Gm6793, BC027582, Sulf2, Mis18a, Acap3, Adra2a, Cbx4, Taf4b, Zfp382, Gm19345, Gm20695, Aldh16a1, Scaf4, Nelfa, Spr, Flywch1, Mdm4, Gm10702, Gm20387, 6030442K20Rik, Arid1a, Prpf40b, Pi4k2b, Tubgcp5, Mrps35, Lclat1, Ubtfl1, Gm19246, Yam1, Slc16a12, Cers5, Rfc1, Ccp110, Emp3, Lrrc8c, BC029722, Gm8750, Mapk7, Dmap1, Abcc1, Pds5a, Rfc3, Ccbl2, Kcnmb4, Csnk2a1, Gm20427, Mtif3, Cox4i2, Rfc2, Fip1l1, Cct2, BC052040, Cgrrf1, Zfp808, Gm23416, Mpdu1, Ifrd2, Psg29, Rufy3, Rpap1, Cchcr1, Zfp78, Wt1os, Gm20659, Uqcrb, Raver1, Acy1, Plac8, Ino80, Pex2, Gm9968, Znhit2, Hmgcs1, Pde8b, Pigyl, Agpat4, Cxcl9, Bzrap1, Mterf1a, Srsf11, Mir686, Ighv1-80, Larpp4, Dhdb, Chd1, Vps29, Zfc3h1, BC018242, Cd47, 2700094K13Rik, Gm17258, Gtpbp2, Tmem167, Phf10, Anapc7, Rbidd3, 1110051M20Rik, Zfp709, Gm24132, Gm10045, Spast, Etv5, Ehd3, Camkk2, Arhgap27, Mis12, Cars2, Gm24603, Gm11942, Tcf7l2, Med16, Msh2, Mrpl1, Thoc5, Gemin8, Lrfl1,*

*Gm26259, Gm21769, Sfxn3, Zfp385c, Dync2li1, Prkab1, Dnajc17, Camta2, Lig1, Klhdc7a, Gm22007, Nab2, Strip1, Slc23a1, Srsf9, Rsrc1, Il17rd, Mpp7, Gm10935, Rbm4, Paqr8, Fhod1, Nelfe, Acads, Setmar, Eif4h, E2f6, Gm13212, Zfp870, Cenpl, Zdhbc12, Pdgrfrb, Tmem168, Ppp1r21, Eml2, Arl16, BC024978, Dynlt1f, Atp6v1h, Celsr1, Pcgf5, Mmab, Mrpl34, Szrd1, Bak1, Cyp2t4, Supt20, Cog7, Lonrf3, Rps6kb2, Zfp12, Cobll1, Psme4, Mdn1, Gm14391, Gm4755, Dennd1a, Pp-fibp1, Pitpnm1, Usp30, Dopey1, Arhgef1, Sdhc, Tgtp1, Gm26792, Fbxo8, Med24, Ehbp1l1, Aimp2, Tbr1, Iqsec2, Zfp420, Zfp429, Gm17586, Ak5, Exosc10, Pik3ap1, Glcci1, Rrp12, Clus1, Map2k5, Zfp456, Gm19705, Gvin1, Top2b, Casp7, Gigyf1, Gcf2, Rbbp8, Eif4b, Kdelr2, Gm6297, Zc3hav1l, Igfbp4, Got1, Tpk1, Ap2b1, Usp1l, Ccser2, Mphosph8, Gm26515, Gm5129, Atad5, Lztfl1, Ssbp1, Ints6, Glts-cr2, Thra, Psme2, A630072L19Rik, Idi1, Stard3, Flnb, Mrpl19, Tanc1, Pyroxd1, Cds2, Utp14b, 4632428C04Rik, Nkx6-3, Srsf1, Polr3a, Tmf1, Lars2, Lrrc29, Nap1l1, Tmsb10, Gm7928, Gm4149, Ict1, Ptprj, Foxp1, Fam175a, Coq5, Rps27a-ps2, Fdx1l, Gm16897, Gm14440, Pelp1, Cdk2, Klrc1, Adrb1, Tram2, Ccerc5, Gm26302, Gm26617, Gbp6, Gm16515, Cd151, Kcnj8, Pcdh17, Arhgef11, Usp47, Gm14324, 9030407P20Rik, Pank3, Slfn3, Atrip, Lrmp, Zhx3, Rassf4, Zc3b4, B230307C23Rik, D630044L22Rik, Atp5a1, Cops3, 0610011F06Rik, Ogg1, Tmem55b, Msantd2, R74862, Rpl10-ps1, Gm26733, Creb3l1, Cdc37, Wdr24, Creld1, Sigmar1, Armc5, Wdr83os, Gm7332, G730003C15Rik, Afg3l1, Ap4m1, Nrp1, Ing4, Prr5, Dennd4b, Ppp2r5d, Rpl38-ps2, Gm26798, Adarb2, Tbk1, Fam20c, Mark4, Acaa1a, Dhx29, Tcea2, Gm13772, Gm26675, Dot1l, Yeats4, Mettl21a, Gas2, Snapc4, Clgalt1, Taf1b, Rps15a-ps7, Gm26562, Rpl31-ps8, Prmt2, Rpe, Cib1, Noa1, Usp22, Suw420h2, Gm8722, Gm20033, Sh3bp5l, Fzr1, Ica1l, Aen, Tmem258, Gucy2c, Trim5, Gm14303, Gm17259, Mapk1ip1l, Aldh1l2, Casp8, Det1, Tbcc, Sipa1l1, Ube2s, Gm4853, 9330104G04Rik, Ly6i, Sptbn1, Ercc5, Gm9755, Exoc1, Wbp5, Rpl26, Gm15821, Gm26601, Mtch1, Mdh1, Pask, Nsmce1, Hif1an, Gm14117, Slc38a10, Gm12490, Gm26917, Dhx15, Cnot6, Sept2, Bcl7c, Arhgap21, D830025C05Rik, Naca, Gm14276, Gm27027, Ube2k, Clk4, Ing5, Nucb1, Tssc1, Rtn4r, Snrpa, Gm12870, Gm27012, Agpat6, Sar1b, Ccnt2, Tacc2, Tubb4b, Pced1b, Gm10101, Gm15765, Rpl24, Srpr, Tnip1, Cd55, Ubfd1, Lin37, Dsg2, U2af1, Gm16177, Gm28039, Phf20, Vdac1, Pigr, Arfip2, Arhgef26, N6amt1, Bod1l, Gm12961, Gm27995, Gm13166, Tns3, Pik3c2b, Rrp8, Rbm17, Ascc1, Sucg2, Gm11462, Gm27251, Gm13625, Myo1g, Mnda, Lyrn1, Traf3ip3, Tlr7, Ccdc62, Gm11764, Sept1, Mir5136, Drg1, Vangl2, Eri2, Actr1b, Kctd21, Rpl34, Gm14422, Myo18a, Pikfyve, Polm, Hsd17b7, Cdk16, Srrt, Dmd, Gmfb, Gm14300, Rpl13, Ctnna1.*

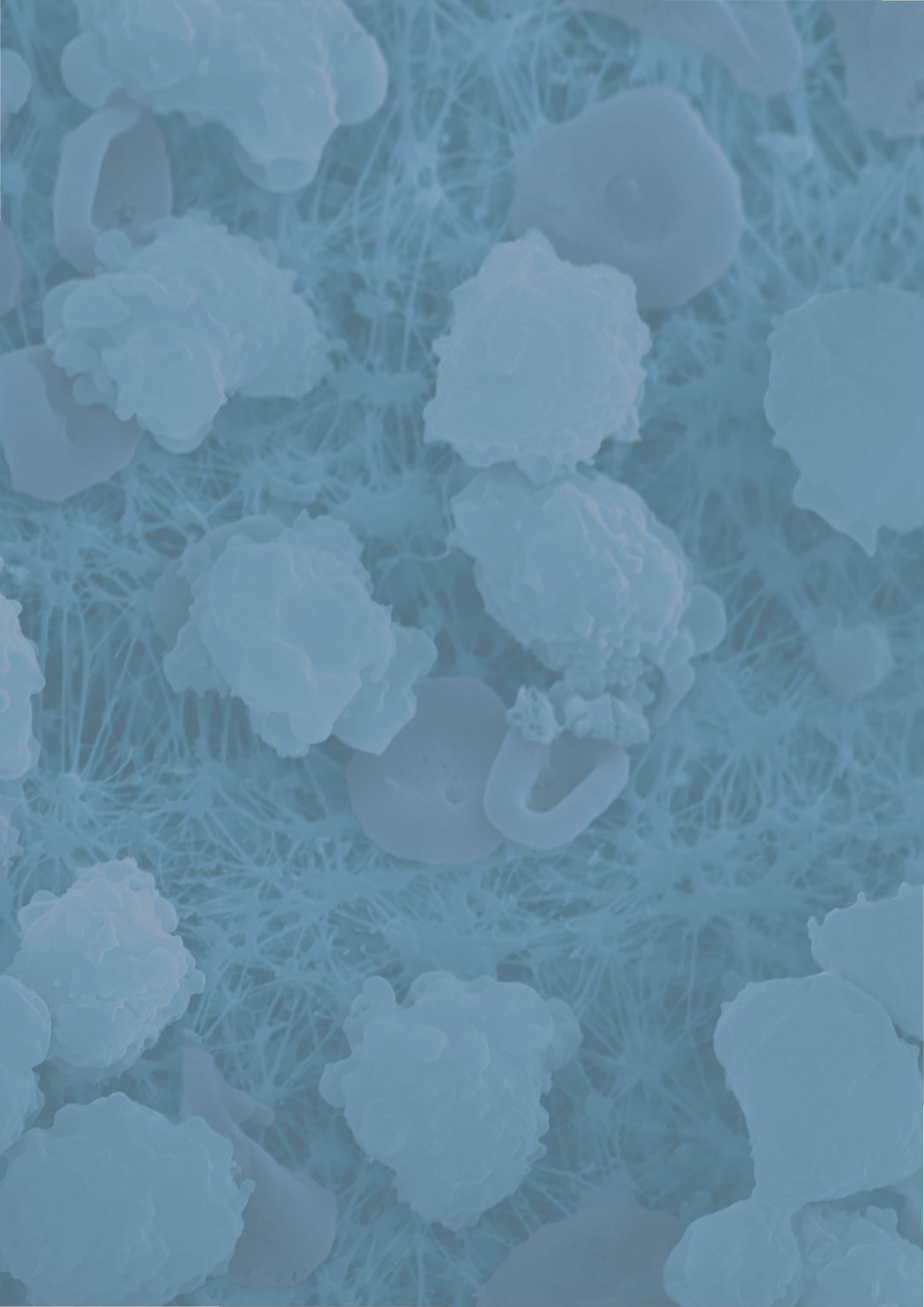












**L**os neutrófilos son los leucocitos más abundantes en la circulación y representan la primera barrera de defensa contra microorganismos. Su número en circulación muestra un comportamiento circadiano. Tienen una vida corta, en el rango de horas desde que salen de la médula ósea hasta que son eliminados de la circulación. En ese lapso de tiempo sufren un proceso conocido como envejecimiento que provoca cambios fenotípicos. Así, durante el día los neutrófilos muestran un fenotipo “*envejecido*” (o senescente) y durante la noche un fenotipo “*fresco*”.

El proceso de envejecimiento de los neutrófilos es un programa transcripcional global controlado por el reloj molecular y la señalización de dos receptores de quimioquinas, CXCR2 y CXCR4. Los neutrófilos frescos tienen mayor capacidad de migración hacia los tejidos inflamados, pero el envejecimiento de los neutrófilos es necesario para su eliminación homeostática de la circulación, un proceso que permite su movimiento hacia los tejidos. Esta infiltración circadiana de los tejidos anticipa y fortalece la defensa frente a infección, pero la presencia excesiva y constante de neutrófilos envejecidos en los tejidos puede provocar daño en caso de activación excesiva. La presencia de neutrófilos envejecidos en circulación puede provocar, además, daño vascular en condiciones de activación patológica como en infarto de miocardio. Esto correlaciona con la formación de trombos diseminados intravasculares.

Proponemos que el sistema inmune ha desarrollado un sistema dinámico de regulación de la biología de los neutrófilos basado en fluctuaciones circadianas. Este sistema oscilatorio permite compartimentalizar temporal y espacialmente a los neutrófilos gracias al proceso de envejecimiento. De esta manera, asegura la defensa de tejidos a la vez que previene el daño inflamatorio a la vasculatura.

